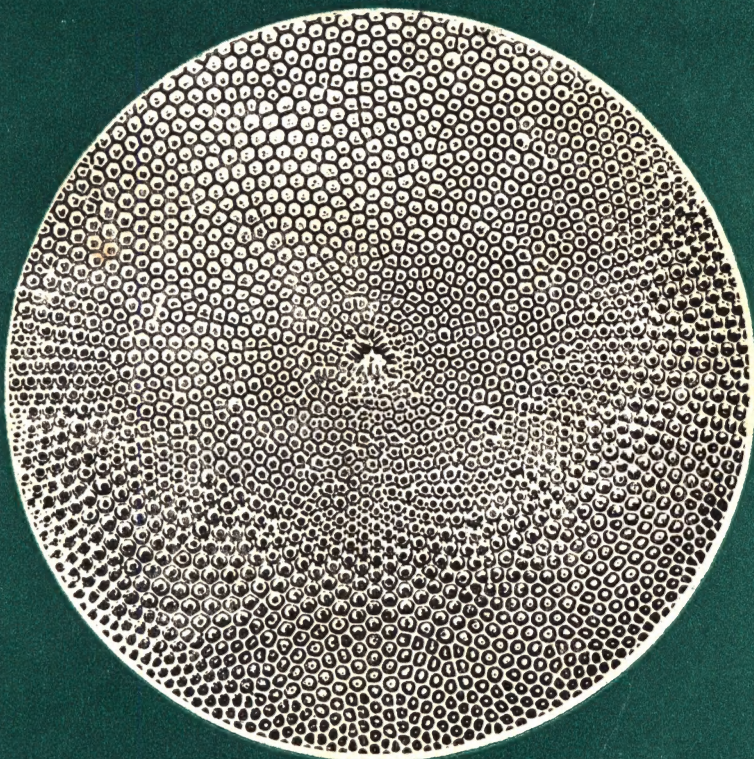


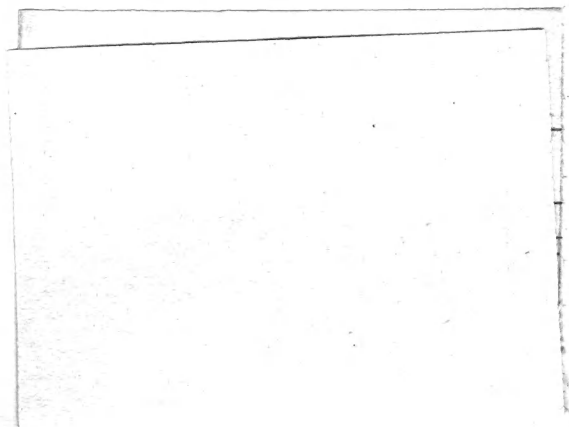
28.0 > 25
5 63

ЗНАНИЕ

НАРОДНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ •
естественнонаучный факультет

БИОЛОГИЯ НАШИХ ДНЕЙ





ЗНАНИЕ

НАРОДНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ •
естественнонаучный факультет
Издается с 1961г.

БИОЛОГИЯ НАШИХ ДНЕЙ

выпуск второй

составитель
кандидат биологических наук
А.Х. Тамбиев

Издательство «Знание»
Москва 1987

ББК 28.0
Б63

> 25

Рецензенты: Д. Г. Звягинцев — профессор,
А. П. Пехов — доктор биологических наук, профессор

29436

**Б63 Биология наших дней: Сборник. Вып. 2.— М.:
Знание, 1987.— 160 с.— (Нар. ун-т. Естественно-
научный фак.).**

50 к.

40 000 экз.

Сборник посвящен актуальным вопросам современной биологии: микробиологии, генной инженерии, биотехнологии.

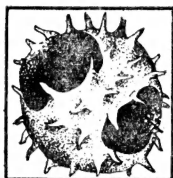
В книге рассматриваются вопросы синтеза разнообразных продуктов, создания безвирусного растениеводства, проблемы искусственного выращивания съедобных грибов и другие, имеющие важное народнохозяйственное значение.

Книга предназначена для всех, кто интересуется современными проблемами биологии, и может быть полезна слушателям народных университетов естественнонаучных знаний.

Б 2001000000—122 29—87
073(02)—87

ББК 28.0

© Издательство «Знание», 1987 г.



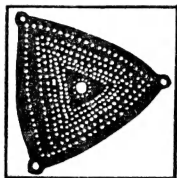
Предисловие

Сборник «Биология наших дней» (выпуск второй) является более целенаправленным по тематике, чем предыдущий, в нем освещается ряд актуальных проблем микробиологии, вирусологии, микологии, альгологии, генной инженерии, показывается связь их между собой, выход в биотехнологию, перспективы решения и практическая значимость.

Таким образом, статьи сборника посвящены «горячим точкам» разных отраслей современной биологической науки. Тут материал об архебактериях, недавно открытых микроорганизмах, которые, возможно, были одними из первых живых форм на Земле. Характеризуются новые формы анаэробных бактерий, рассматривается современное состояние и перспективы развития биоготехнологии, основанной на использовании человеком биохимической деятельности микроорганизмов, а также проблемы прикладной фитовирусологии, решение которых дает мощный толчок развитию сельского хозяйства. Излагаются проблемы искусственного разведения грибов для получения дефицитной белковой пищи, увеличения кормов и производства ряда полезных веществ. Рассматриваются простейшие как малоизвестные пока объекты биотехнологии, которые, однако, могут быть использованы и уже дают ряд важных биологически активных соединений. Описывается новое перспективное направление по получению культур тканей практически значимых макрофитных водорослей, освещаются вопросы генной инженерии растений, решение которых должно привести к направленным изменениям их геномов и модификации свойств в нужную для человека сторону.

Материалы сборника написаны известными учеными и даются на современном уровне с привлечением новейших данных. В статьях сборника хорошо прослеживается связь фундаментальных исследований с практической направленностью в народное хозяйство.

Член-корреспондент АН СССР
Е. Н. Кондратьева



Л. И. ВОРОБЬЕВА,
доктор биологических наук

Археобактерии

Видимо, следует начать с того, что открытие нового царства археобактерий группой американских ученых Иллинойского университета под руководством К. Вуза в 1977 г. явилось величайшим событием в биологии. Его сравнивают с открытием нового континента, например Австралии, где удивленному взгляду первооткрывателей предстали кенгуру вместо лошадей и эвкалиптовые деревья вместо елей. Но обнаружение нового царства значительно не только само по себе. Изучение археобактерий открыло широкие перспективы: 1) для понимания ранней истории жизни на Земле; 2) происхождения эукариотической клетки и 3) создания естественной классификации бактерий на основе их филогенетического родства. Открытие этого нового царства организмов было необычным для микробиологии в том смысле, что в группу археобактерий включают метаногенные, экстремально галофильные и термоацидофильные бактерии, с которыми давно работали, видели их своеобразие, но не предполагали, что они представляют новое царство прокариот. Его обнаружение походило на раскопки «греческого сокровища», так подлинно и художественно описанные в одноименном романе Ирвинга Стоуна. Вы помните, как знаменитый немецкий археолог конца XIX в. Генри Шлиман принял за «гомеровскую» Трою другую Трою, которая была построена в III в. до н. э. и на 1200 лет позже «гомеровской». Методы, примененные тогда Г. Шлиманом (сейчас они кажутся варварскими), в принципе были аналогичны тем, которые использовались при открытии археобактерий. Г. Шлиман разрушал фундаментальные постройки, многочисленные сооружения, чтобы добраться до надписей и знаков, могущих доказать достоверность «гомеровской» Трои.

Составные части клетки, ее стенки, мембраны, геном, рибосомы — сложные архитектурные ансамбли живого организма. Ученые тоже провели их «раскопки», сначала разрушив эти «сооружения» до основания, до молекул, а потом проанализировали их состав и сравнили его с составом соответствующих компонентов у других организмов.

Собранные факты, о которых мы собираемся рассказать, позволили дать характеристику древнего и заново открытого царства, подобно тому как археологи по захороненным веками предметам и постройкам описывают облик, возраст и былую мощь ныне мертвых городов. Но не возникает ли у читателя вопроса или даже недоумения в связи с тем, что древнее царство **живых и живущих** существ (а ему, по-видимому, не менее 3,5 млрд. лет) было открыто так поздно. Дело в том, что для бактерий особенно большие трудности представляет определение границ высших систематических единиц — таксонов. Метод молекулярной гибридизации¹ (гибридизации ДНК или ДНК · РНК двух разных организмов), так хорошо зарекомендовавший себя для определения родства филогенетически близких видов, не подходит для эволюционно далеких.

Бактерии часто мутируют, им свойствен малоспецифический перенос генетических элементов; в течение длительной эволюции могли накопиться большие изменения в генетике, строении белков, не говоря уже об изменениях фенотипических признаков. Возможна также конвергенция видов. Все это затрудняло сравнение далеких в филогенетическом отношении видов, и успех группы К. Вуза был определен именно удачным выбором информационной хронометрической молекулы для измерения филогении. Считают, что макромолекулы (белки, РНК, ДНК) — это молекулярные хронометры. Белки подобны часам, отсчитывающим время процесса эволюции. Замены аминокислот в белках — ошибки при синтезе, накапливаются почти с постоянной скоростью на протяжении длительного времени, при этом равномерность эволюции белков отражает постоянную скорость эволюции ДНК. Изменения в последовательности субъединиц макромолекул позволяют судить не только об эволюционном родстве, но и об эволюционном расстоянии — относительном времени расхождения групп организмов. Для определения дальнего филогенетического родства требовалось: 1) чтобы молекула-хронометр мало менялась в эволюции; 2) конечно, надо, чтобы она присутствовала у всех клеток и 3) обладала функциональным постоянством, так как сильные функцио-

¹ Когда одноцепочечные ДНК смешивают с другими ДНК (или РНК), они гибридизуются (связываются) с теми участками, в которых имеются комплементарные им последовательности нуклеотидов.

нальные ограничения снижают скорость эволюционных изменений. На эту роль подходили рибосомы. Их нетрудно выделять. Они присутствуют в каждой живой клетке и имеют постоянную функцию и высокостабильную последовательность оснований РНК. Кроме того, исследования химических свойств РНК свидетельствуют в пользу того, что она возникла раньше, чем белки или ДНК, и является самым древним биополимером. Из трех рРНК 16S (18S)², 23S (25—28S) и 5S наиболее подходящей на роль маркера была признана 16S рРНК, которую метили радиоактивным фосфором, выделяли и обрабатывали специфической рибонуклеазой T_1 . Полученные олигонуклеотидные сегменты разделяли методом двухмерного электрофореза и получили каталог последовательностей, характерный для организма, который изучали.

Для анализа отбирали сегменты, содержащие не менее 6 или более пар нуклеотидов. Такие сегменты почти всегда уникальны, в целом они содержат 500—600 нуклеотидных остатков, что составляет около 35 % всех остатков 16S рРНК.

Анализу было подвергнуто около 200 различных организмов, которые сравнивали по бинарному коэффициенту ассоциации S_{AB} , позволяющему судить о количестве гомологичных генетических последовательностей, называемых «летописью» живых ископаемых».

$$S_{AB} = \frac{2 \cdot \text{сумма оснований олигонуклеотидов, общих для } A \text{ и } B}{\text{сумма всех оснований у } A \text{ и } B},$$

где A и B — нуклеотидный каталог двух разных организмов. Значения S_{AB} находились в пределах от 1,0 (для двух идентичных штаммов) до 0,02 (для штаммов совершенно неродственных). Значит, чем выше S_{AB} , тем более родственны организмы.

При сопоставлении коэффициентов S_{AB} на высшем таксономическом уровне выявились не две группы, как можно было ожидать, исходя из разделения живых существ на эукариоты и прокариоты, а три. Одну группу составили все эукариоты, точнее, ядерно-цитоплазматические компоненты эукариот, так как их органеллы — митохондрии и хлоропласты, не вошли в эту группу, вторая группа представлена большинством известных бактерий — эубакте-

² В скобках даны величины для соответствующих рРНК эукариот.

рями (их называют также классическими или истинными), сюда же включают эукариотические органеллы, и третью группу составили архебактерии, состоящие из нескольких групп организмов, которые живут в экстремальных условиях: метаногенные, галобактерии, аэробные и анаэробные серозависимые бактерии и термоацидофильные микоплазмы (термоплазмы). Различие коэффициента S_{AB} 18S рРНК эукариотических рибосом и 16S рРНК прокариот было не больше, чем внутри самой группы прокариот. Поэтому К. Вуз предположил, что существовали три первичных царства: зубактерии, архебактерии и первичноядерные (уркариоты) — предки эукариот (рис. 1). При изучении состава и строения других частей клеток методами молекулярной биологии удалось показать, что сходства и различий у архебактерий с зубактериями не больше, чем с эукариотами.

Клеточные стенки. Большинство зубактерий покрыто ригидной (жесткой) клеточной стенкой, содержащей уникальное вещество пептидогликан (муреин). Еще недавно считали, что пептидогликан может служить маркером прокариотной клетки, но оказалось, что у архебактерий отсут-

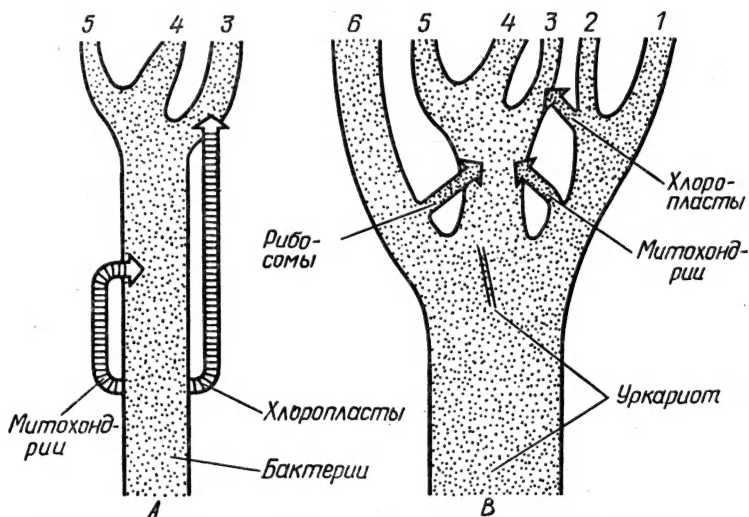


Рис. 1. Прежнее представление о происхождении живых существ (А) и три первичных царства, предложенные группой Вуза (В): 1 — бактерии; 2 — цианобактерии; 3 — растения; 4 — грибы; 5 — животные; 6 — архебактерии (по Kaiser, 1981)

ствуется муреин, этим объясняется их устойчивость к ингибиторам синтеза пептидогликана — антибиотикам пенициллину, цефалоспирину и др. У археобактерий обнаружены удивительные вариации клеточных стенок, оболочечных структур и полимеров.

Вариации клеточных покровов у археобактерий позволяют предположить, что покровы были поздним приобретением в эволюции и одели клетки после разделения главной эволюционной линии галофилов и метаногенов. Появление оболочек сделало клетки устойчивыми к различным окружающим условиям, например осмотическому давлению и его изменению. Клетки археобактерий без клеточной стенки были менее адаптированы, оказываясь более или менее ограниченными условиями среды — то, что сейчас называют экстремальными условиями, — но которые могли быть совершенно обычными в ранний период жизни на Земле.

Размножение. У археобактерий обнаружено множество способов размножения. Клетки метаногенов и галофилов делятся, как и клетки эубактерий, поперечной перегородкой. У серозависимых археобактерий встречается почкование, ветвление без образования клеточной перегородки, разлом, фрагментация. Некоторые из этих механизмов деления имеются у эубактерий.

Липиды. Археобактерии содержат совершенно уникальные мембранные липиды, в которых не обнаружены обычные для классических бактерий и эукариот эфиры глицерина и жирных кислот, но присутствуют простые эфиры глицерина, которые встречаются в виде C_{20} — фитанилового диэфира или в виде C_{40} — бифитанилового тетраэфира, и нейтральные C_{20} — C_{28} изопреноидные углеводороды. В алкильных цепях термоацидофилов содержатся от 1 до 4 циклопентиловых колец, причем число колец в цепи изменяется в связи с температурой культивирования. Чем выше температура, тем больше бициклических и меньше ациклических цепей. Кольцевые структуры увеличивают жесткость мембраны, контролируют ее плотность и толщину, что может быть очень нужно для клеток, растущих при высоких температурах. Полагают, что присутствие тетраэфиров в мембране может принципиально изменить ее строение. На сколах с замороженных клеток термоацидофильных бактерий и некоторых метаногенов внешняя и внутренняя стороны мембраны не обнаруживаются, как получается в случае элементарной бислойной

мембраны; вместо этого происходит поперечный разрыв клетки. Во всяком случае надо признать, что **двухслойная мембрана не может считаться теперь универсальной моделью мембран живых организмов. Видимо, существует еще монослойная мембрана археобактерий с физической размерностью биослоя.** У термоацидофилов *Thermoplasma* и у *Sulfolobus* встречается еще серия алкилбензолов, которые в других организмах никогда не встречаются, но выделяются из нефтей и осадочных пород, и вообще археобактерии содержат те же гомологи изопреноидных углеводов, которые находят в нефтях. Это неудивительно, если вспомнить, что археобактерии живут в условиях, которые превалировали в архейскую эру, поэтому очень может быть, что многие или даже все изопреноидные соединения, обнаруживаемые в нефтях и осадочных породах, были синтезированы археобактериями и родственными организмами. В условиях высокой солености углеводороды плохо разлагаются и могли аккумулироваться в осадках соленых водоемов. Уникальные изопреноидные липиды археобактерий обнаружены в микробных матах ряда горячих источников Йеллоустонского национального парка. Считают, что изопреноидные липиды можно использовать в качестве специальных молекулярных маркеров для популяции археобактерий в природных сообществах.

Синтез белков и белки. Синтез белков археобактериями происходит по тому же принципиальному пути, что и у других организмов, но имеются различия в первичной структуре информационных молекул: тРНК, рРНК, РНК-полимеразы, что отражается на важных деталях многих молекулярных процессов. Археобактериальная РНК-полимераза, особенно у серозависимых археобактерий, сходна с эукариотной и, как последняя, нечувствительна к рифампицину и стрептолидигину. Рибосомы археобактерий сочетают в себе свойства как эубактерий, так и эукариот. Бактериальные рибосомы осаждаются при ультрацентрифугировании со скоростью 70S (*S* — коэффициент седиментации), и их называют 70S-рибосомы. Цитоплазматические рибосомы эукариот — 80S-частицы, а рибосомы митохондрий и хлоропластов относятся к бактериальному типу (70S). По размерам частиц археобактериальные рибосомы такие же, как эубактериальные, но по количеству белков занимают промежуточное положение между эубактериями и эукариотами. На археобактериальной рибосоме отсутствуют места связывания типичных ингибиторов бак-

териальных рибосом — хлорамфеникола и стрептомицина, — и в то же время есть места для связывания с типичным ингибитором рибосом эукариот. Архебактерии имеют много других эукариотных черт. Факторы элонгации³ рибозилируются у них с помощью дифтерийного токсина, как и факторы элонгации эукариот, но не эубактерий. Совсем недавно у архебактерий обнаружен процессинг: вырезание из первичного транскрипта (мРНК) предшественника и дальнейшее укорачивание и образование зрелых мРНК (рРНК). До сих пор процессинг был известен только у эукариот.

Нуклеиновые кислоты и организация генома. У архебактерий наблюдается необычная модификация тРНК и рибосом. В тРНК всех организмов урацил замещен на тимин в одном месте, а у архебактерий нет ни тимина, ни урацила. Вместо урацила у них — псевдоуридин или другой, пока еще неидентифицированный нуклеотид. Архебактериальная 5S рРНК имеет уникальную вторичную структуру и ряд других свойств, сближающих ее с эукариотной 5S рРНК больше, чем с прокариотной. Генетический код архебактерий такой же, как в других царствах. Кольцевая ДНК представляет геном. У некоторых архебактерий (*Sulfolobus*) обнаружены основные гистоноподобные белки, связанные с ДНК. Кишечная палочка узнает и может экспрессировать гены архебактерий. Плазмиды (маленькие кольцевые ДНК) редко встречаются в группах архебактерий, но в *Sulfolobus* обнаружены фагоподобные ДНК-содержащие частицы, похожие на аденовирусы, а у *Thermoproteales* открыты ДНК-содержащие вирусы, напоминающие вирусы растений и животных. У некоторых метаногенов обнаружены плазмиды и специфические бактериофаги.

Другие сходства и различия. С эукариотами архебактерии роднит родопсиноподобный белок экстремальных галофилов (у позвоночных в зрительном пурпуре содержится родопсин), специфические сходства А-белка рибосом, большое число повторяющихся нуклеотидных последовательностей в хромосомной ДНК, наличие в генах интронов (некодирующих участков). Имеются специфические сходства с эубактериями, например величина рибосом и их субъединиц. У архебактерий есть и совершенно

³ Факторы белковой природы участвуют в удлинении полинуклеотидной цепи в рибосомах.

уникальные свойства, к которым, например, относятся необычные коферменты метаногенов (см. дальше). Наконец, у эубактерий и эукариот тоже есть специфические сходства в составе липидов, содержании риботимидина в тРНК и др. Полученные учеными факты имели большую ценность для понимания эволюции живых существ, а, как писал генетик Ф. Добржанский, «любое биологическое явление можно считать осмысленным только в свете эволюционных представлений».

Об общем предке. В целом приведенные факты достаточно убедительно показывают, что архебактерии представляют самостоятельную эволюционную линию, но имеют общего с эубактериями предка. Отделение от общего предка произошло на очень раннем основополагающем уровне, поскольку сходства между организмами проявляются на молекулярном уровне: существуют общие биохимические свойства, родственные макромолекулярные последовательности, универсальный генетический код.

Что же представлял собой универсальный предок? И каково происхождение эукариотической клетки? Вот центральные вопросы, которые ждут аргументированных ответов.

Предполагаемого общего предка называют прогенотом, тем самым подчеркивая, что он был более простым рудиментарным существом, чем прокариот. У прогенота, видимо, легко изменялись функции, которые в состоянии прокариота были уже более сложными, более интегрированными и не могли легко изменяться. Он, видимо, не имел современного сложного аппарата транскрипции⁴, трансляции⁵, молекулярные механизмы были неточными и более примитивными. Предполагают также, что прогенот не имел клеточной стенки, ограничивающей перенос генов, который существует теперь. У него было меньше генов и более высокая скорость мутации. Но прогенота не представляют себе как уникальное существо, скорее универсальное предковое состояние, в котором начинали работать многие жизненные процессы. Мир прогенотов мог выглядеть как собрание полуавтоматических субклеточных существ, которые как-то группировались, давая плохо подогнанные клеточные формы. В таком состоянии легко

⁴ Переписывание информации, записанной в ДНК, в РНК.

⁵ Синтез белка, согласно информации, записанной в РНК.

происходил обмен генетической информацией и молекулярными структурами.

Когда из прогенотов возникали прокариоты, то информационные процессы становились более точными, степень переносов снизилась. Появились отдельные линии потомков с некоторым смещением молекулярных фенотипов. Предком эукариот не мог быть прокариот, как думали раньше. Между прокариотами и эукариотами существует огромный провал, который невозможно заполнить различными эндосимбиотическими ассоциациями, хотя эндосимбиотическое происхождение хлоропластов и митохондрий учеными поддерживается⁶. Они имеют размеры бактерий, рибосомы бактериального типа и высокую степень гомологии 16S рРНК с таковой у эубактерий.

Предполагается, что основоположником эукариотической клетки был уркариот, который произошел из прогенота раньше, чем были образованы митохондрии и хлоропласты. Уркариот относится к линии цитоплазматических элементов, например, ядра всех высших клеток, ранее обозначавшихся эукариотами. Поэтому очень важно понять, как возникло ядро. Ядро эукариотической клетки содержит эубактериальные гены, видимо, приобретенные из генома органелл, гены архебактерий (например, гены рибосомального А-белка), а также гены третьего происхождения, возможно, гипотетического эукариотного клеточного хозяина — уркариота. Значит, не только сама клетка, но и ее ядро тоже химера.

Можно представить себе, что, когда прогеноты существовали в мире прокариот, они должны были ограничить прием чужого генетического материала (так как в большом количестве он мог быть вредным), и тогда имелись две возможности: 1) ограничиться от приема чужого генетического материала, например, клеточной стенкой, как это сделали архебактерии и эубактерии; 2) принимать его и использовать в своем эволюционном развитии. Но во втором случае требовался контроль проявления (экспрессии) чужого генетического материала, что, как предполагают, и было причиной эволюции ядра. Если экспрессия чужого генетического материала становилась выгодной, то клетка могла вставить в него необходимые последовательности для созревания и последующей трансляции.

⁶ А. Вилсон считает, что фотосинтез возник у общего предка хлоропластов, эубактерий и галобактерий и не связан с эндосимбиозом.

Итак, от общего предка (см. рис. 1) по современным представлениям пошли три эволюционные линии: эубактериальная, архебактериальная и эукариотная, которая получила рибосомы от предков архебактерий, а митохондрии и хлоропласты — от предков эубактерий. Значит, архебактерии и эубактерии прямо возникли из прогенота, а современный тип эукариотной клетки появился в результате слияния древнего эукариота (первичноядерного) с бактериями. Следовательно, ядро эукариотной клетки — образование не менее древнее, чем бактериальная клетка.

А может быть четыре первичных царства? Когда К. Вуз провозгласил об открытии нового царства, у него было мало сторонников. В кругах ученых давно укоренилось представление о дихотомичности живого мира. Древние философы считали, что мир состоит из растений и животных. После открытия микроорганизмов главный водораздел был перенесен на место, разделяющее микро- и макроорганизмы; с появлением электронного микроскопа он опустился на более глубокий уровень, а именно на уровень структуры клетки, и все живые существа были разделены на эукариоты и прокариоты. Двум уровням организации клеток соответствовали два типа рибосом 70S и 80S, два типа молекулярных процессов (эукариотный и прокариотный), и никто не думал тогда, что прокариотной организации соответствуют два типа жизни и что различия между этими двумя типами гораздо более глубокие и фундаментальные, чем различия между эукариотами и прокариотами, видимые под электронным микроскопом. Открытие К. Вуза было неожиданным, с трудом пробивало себе дорогу, но оно вызвало большой прилив научных сил и интерес к архебактериям — эти исследования продолжались. И вот в 1984 г. в Институте молекулярной биологии Калифорнийского университета группа ученых под руководством Дж. Лейка приходит к выводу, что царство архебактерий неоднородно и что существует не три, а четыре царства. Отдельное четвертое царство образуют так называемые эоциты. Ученые изучали ультраструктурную организацию рибосом и обнаружили, что группа архебактерий, нуждающихся в сере (*Sulfolobus*, *Thermoproteales*), имеет рибосомы, отличные от рибосом других бактерий, но сходные с эукариотными рибосомами. С эукариотами их роднила также олигонуклеотидная последовательность 16S рРНК, хорошая гибридизация ДНК · рРНК, сходство многих молекулярных процессов. Например, ДНК-зависимая РНК-

полимераза эоцитов состоит из белковых единиц с молекулярным весом и иммунологическими свойствами, более сходными с эукариотной полимеразой А, чем с архе- или эубактериальной. В генах тРНК-эоцитов обнаружены те же интроны⁷, что и в генах эукариотной тРНК, и ничего подобного не обнаружено у архе- или эубактерий. Вирусы серозависимых архебактерий тоже сближают их с эукариотами. Вместе с тем эта группа обладала рядом уникальных свойств, например, особыми липидами с высоким содержанием тетраэфиров. В их липидах в отличие от других организмов содержатся циклопентанол и алкилбензолы. Сходство эоцитов с эукариотами делает их очень важными и интересными объектами для понимания происхождения эукариотической клетки. Некоторые исследователи считают, что галобактерии, имеющие сходства с фототрофными эубактериями в отношении переносчиков электронов и каротиноидов, должны составить с последними единую группу под названием фотоцитов, так что не все ученые придерживаются единого мнения относительно положения архебактерий в системе микроорганизмов.

Возраст Земли — 4,5 млрд. лет, и ее первые обитатели, как полагают, были предки прокариот — прогеноты. Через 1,5 млрд. лет после образования Земли в течение почти 3 млрд. лет бактерии были доминирующей формой жизни (рис. 2), и только в последние 600 млн. лет, после появления высших организмов господство бактерий закончилось.

Серозависимые архебактерии и термоплазмы. К первым относят бактерии порядка *Sulfolobus* и *Thermoproteales*. *Sulfolobus* обитает в горячих кислых водоемах и почвах, в вулканических расщелинах. Энергию получают за счет окисления H_2 , элементарной серы, некоторые могут окислять также двухвалентное железо и сульфиды металлов и усваивают углекислоту. Недавно обнаружено, что *Sulfolobus* может получать энергию и при восстановлении элементарной серы, выступающей конечным акцептором электронов, — это и был мостик, связывающий *Sulfolobus* с анаэробными *Thermoproteales*, которые живут при температуре кипящей воды. Они осуществляют новый ранее неизвестный тип анаэробного чисто хемолитотрофного метаболизма, при котором бактерии ассимилируют

⁷ И н т р о н — часть гена, «переписывающаяся» в РНК, но затем из нее удаляемая ферментативным путем при образовании мРНК.

CO₂ за счет окисления H₂, а элементарную серу используют как конечный акцептор электронов. Представители рода *Pyrodiction* (в переводе — «огненная сеть») в порядке *Thermoproteales* имеют сеть фибрил, которые, как полагают, предохраняют клетки от сверхвысоких температур. Они увеличивают клеточную поверхность и играют роль «могучего генератора», способствующего получению дополнительного количества АТФ. Для клеток это очень важно, поскольку помогает им вновь синтезировать органический материал, разрушенный при высоких температурах. Эти бактерии растут при 108 °С и не растут при температуре ниже 80 °С. Это анаэробы. Примитивные механизмы клеточного деления (см. выше) серозависимых архебактерий и их примитивный анаэробный способ получения энергии путем дыхания серой или образования H₂S соответствуют условиям Земли в то время, когда развивались простые формы жизни. Удивительная термостабильность их белков поддерживает это предположение. По-видимому, не температура ограничивает жизнь, а наличие жидкой воды. При давлении 265 А вода кипит только при 460 °С. Видимо, поэтому экстремальные термофилы живут при очень высоких давлениях. Изучение бактерий вообще сильно расширило наши представления о температурных пределах жизни. Недавно советские ученые обнаружили, что микроорганизмы могут сохранять жизнеспособность свыше 2000 лет, находясь в различных слоях ледника Центральной Антарктики. В группу термоацидофилов включают лишённые клеточной стенки термоплазмы, которые нашли себе пристанище в саморазогреваю-

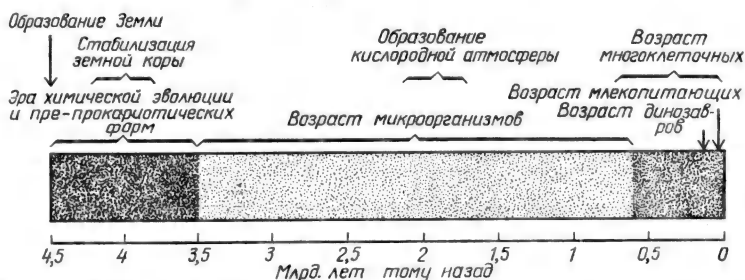


Рис. 2. Биологическая эволюция и шкала геологического времени (Woese, 1981). Ископаемые прокариотических клеток обнаружены в отложениях возраста 3,5 млрд. лет. Самым ранним ископаемым эукариотической клетки примерно 1,3 млрд. лет. Макроскопические ископаемые относятся только к периоду 600 млн. лет, когда появились первые многоклеточные организмы

щихся угольных кучах при температуре 55—65 °С и при рН 1,5—3,5.

Галобактерии. Это удивительнейшая группа бактерий, заселяющих самые соленые водоемы на Земле, которые обычно встречаются в жарких местах. Они лучше всего растут в среде, которая содержит 20—30 % NaCl, т. е. в насыщенных растворах поваренной соли. Если эти бактерии поместить в пресную воду, то их мембраны дезагрегируют и содержимое клеток вытекает. Галобактерии живут в Великом Соленом озере, в Мертвом море, в морских солеварнях, из которых добывают соль путем испарения воды на солнце. На кусочках соли они годами сохраняются живыми. Из пустынного щелочного озера в Египте выделены алкалофильные галобактерии. Их называли *Na-tronobacter* — *Halobacterium pharaonis*, потому что добыча солей из этих мест производилась еще со времен фараонов. Галобактерии живут на сухой соленой рыбе, на кожаных изделиях и вызывают их порчу.

Экстремальные галофилы (кроме галобактерий) очень редко встречаются в природе, но все-таки есть. Солеустойчивость обычно обусловлена тем, что клетки способны так изменять внутренние условия, что ингибиторное действие соли сильно понижается. Галобактерии тоже используют такие механизмы. Внутри их клеток поддерживается высокая концентрация NaCl.

Уникальность группы определяется тем, что бактерии имеют специфические клеточные компоненты — мембраны и белки, нормальная работа которых происходит только при высоких концентрациях NaCl. Бактерии могут иметь форму палочек, кокков, квадратов.

Благодаря каротиноидному пигменту (бактериорубрину) галобактерии бывают окрашены в розовый, красный и оранжевый цвета. У всех галобактерий присутствуют три фотоактивных пигмента: медленный родопсин⁸, бактериодопсин и галородопсин. Медленный родопсин обеспечивает фототактическую реакцию бактерий: с помощью жгутиков клетки передвигаются в зоны с максимальной интенсивностью света. Квадратные бактерии в естественных условиях содержат многочисленные газовые везикулы, вероятно, обеспечивающие их плавучесть. Галобактерии — гетеротрофы, но способны и к фотосинтезу. Но фотосинтез у них необычный. Он происходит без участия

⁸ Родопсиноподобный белок (slow rhodopsin).

2936
— хлорофилла или бактериохлорофилла, но с участием особого окрашенного белка — бактериородопсина. Когда под лучами жаркого солнца сильно испаряется вода, то концентрация соли в водоеме увеличивается и одновременно снижается растворимость кислорода. В этих условиях в клетках активируется синтез особого окрашенного белка — бактериородопсина, при участии которого происходит превращение световой энергии, и органические вещества водоема, присутствующие обычно в очень небольших количествах, могут расходоваться не для получения энергии, а для процессов биосинтеза. Поэтому неокрашенные галобактерии не вызывают цветения воды, а пигментированные иногда окрашивают воду Великого Соленого озера или морских солеварен в ярко-красный цвет. Бактериородопсин образуется в дискретных пурпурных бляшках в цитоплазматической мембране, и пурпурная мембрана представляет собой простейшую биологическую структуру из известных, которая способна к трансдукции световой энергии. Пурпурная мембрана отличается относительной жесткостью цитоплазматической мембраны, не дезинтегрируется при низкой ионной силе. Такая стабильность позволяет ее выделять в этих условиях для практических целей. При освещении бактериородопсин переносит H^+ из клетки в наружное пространство и поперек мембраны создается градиент электрохимических потенциалов ионов водорода, который может достигать 180 мВ.

Галобактерии содержат еще другой ретинальбелковый комплекс — галородопсин, который работает как хлоридная помпа. При участии бактериородопсина и галородопсина электромагнитная энергия света превращается в химическую энергию градиента, H^+ и Cl^- на мембране, за счет которой происходит фотофосфорилирование и синтез АТФ. Энергия градиента протонов расходуется также на транспорт ионов Na из клетки наружу в антипорте с протонами, поступающими в клетку, на транспорт ионов K в клетку, который компенсирует выход Na^+ . Особенность галобактерий — очень высокая концентрация K^+ в клетке — минимум 3 М, что превышает его концентрацию снаружи почти в 800 раз. В отсутствие окислительного фотофосфорилирования накопленный в клетке калий обменивается на H^+ и возникающий градиент ионов водорода в течение нескольких часов может поддерживать синтез АТФ в клетках, лишенных солнечного света. Клетки галобактерий осуществляют транспорт Ca сопряженно с

транспортом Na^+ (антипорт) — механизм необычный для бактерий, но известный для эукариот, и транспорт аминокислот (они служат предпочтительным источником углерода), который происходит вместе с Na^+ в клетку.

Таким образом, мы видим, что многие физиологические процессы галобактерий происходят с участием ионов Na , и потому жизнь клеток протекает в условиях высокой солености. В темноте (на свету тоже) галобактерии дышат кислородом, нитратами или могут сбраживать предпочтительно аргинин. Еще о других особенностях галобактерий. Кроме хромосомной ДНК, они содержат сателлитную ДНК, в которой иное содержание ГЦ (66—68 мол. % и 57—60 мол. % соответственно). Галобактерии очень изменчивы. Спонтанные мутации происходят у них с частотой 10^{-2} , у эубактерий — 10^{-8} , а у растений и животных — 10^{-5} (ген). Высокую мутабельность галобактерий связывают с наличием в хромосоме и сателлитной ДНК особых генетических элементов, богатых АТ-последовательностями, а также транспозоноподобного элемента⁹. Галобактерии представляют большой интерес для биотехнологии. Если пурпурные мембраны *Halobacterium* правильно ориентировать на носителе, то при освещении можно получать электричество, АТФ и обессоливать морскую воду. В будущем предполагают с помощью таких маленьких преобразователей энергии обеспечивать электричеством отдельные жилища в странах с высокой солнечной радиацией в течение года. Недавно из морских панцирных жгутиковых выделены новые галоанаэробные виды. Это облигатные анаэробы, но их еще предстоит изучать.

Метаногенные бактерии занимают изолированный биохимический остров в море прокариот. Этот остров характеризуется такими особенностями, как ограниченность субстратов, которые могут быть восстановлены до метана, синтез ряда необычных компонентов клеточных стенок, бифитаниловых эфиров глицерина и высоких количеств сквалена, синтез необычных коферментов и ростовых факторов. Население острова обладает метаболическими механизмами, которые не обнаружены у других традиционных организмов. Эти бактерии имеют очень маленький геном, по размеру составляющий только $\frac{1}{3}$ генома ки-

⁹ Транспозон — подвижный генетический элемент, способный внедряться в разные участки хромосомы и внехромосомной ДНК и вызывать мутации.

шечной палочки. Еще недавно полагали, что изоляции биохимического острова метаногенов способствует стабильность генома. До настоящего времени из метаногенных бактерий не получено ни одного мутанта, но не так давно у них обнаружены транспозоны и плазмиды (мигрирующие генетические элементы), выделены бактериофаги, гены метаногенов клонированы в кишечной палочке, где они транслируются.

Эти удивительные микроорганизмы занимают бескислородные ниши и образуют метан как главный продукт анаэробного метаболизма. Метаногенные бактерии получают энергию для роста при восстановлении самого окисленного соединения — CO_2 до самого восстановленного — CH_4 (водородотрофные метаногены). Предполагают, что водородотрофные метаногенные бактерии были пионерами, заселявшими бескислородные места на Земле, где геохимический молекулярный водород и углекислота служили единственными доступными первичными субстратами. Земля на ранней ступени развития была окутана атмосферой, содержащей в больших количествах CO_2 , N_2 , водяные пары и не более 1 % H_2 , H_2S и CH_4 — условия, которые способствовали развитию бактерий с физиологическими особенностями метаногенов. Метаногены — это прототип организма, существовавшего на ранних этапах развития Земли и, возможно, существующего на других планетах. Теперь они живут в илах пресных и соленых водоемов, в болотах, стволах деревьев, в желудочно-кишечном тракте животных, особенно жвачных, а также людей, рыб и насекомых, в тундровых торфах, термальных источниках, например, в большом количестве их находят в горячем источнике Йеллоустонского парка, в рифтовом африканском озере Киву, в силосных ямах — они занимают бескислородные ниши с низким редокс-потенциалом (Eh). Метаногены чрезвычайно чувствительны к низким значениям Eh, поэтому в чистом виде впервые были выделены только в 1958 г., когда Хангейту удалось разработать специальный метод культивирования этих бактерий. Теперь для выделения и культивирования метаногенных бактерий сконструированы специальные анаэробные боксы, и на сегодня выделено уже большое число штаммов, составляющих 30 видов, 14 родов и 6 семейств.

В природе метаногенные бактерии завершают анаэробное разложение мертвых растений и животных и находятся в зависимости от других бактерий, расщепляющих

полимерные молекулы целлюлозы, крахмала, белков и сбраживающих образующиеся мономеры до CO_2 и H_2 . Они именно завершают процесс, потому что сами могут использовать очень ограниченное число веществ с маленькой молекулярной массой: 1) большинство метаногенов может использовать смесь молекулярного водорода и углекислоты (и/или формиата) — 1-я группа; 2) ацетат и/или метанол вместе с метиламинами — 2-я группа (недавно выделены нитчатые метаногенные бактерии, которые используют только ацетат и не растут за счет H_2/CO_2).

Полагают, что субстратную ограниченность метаногенов обуславливает компактный белковый чехол, образованный над клеточной стенкой и имеющий двухмерную кристаллическую решетчатую структуру. Такой чехол пропускает через себя маленькие молекулы CO_2 , H_2 , CH_4 и не пропускает крупные. Субстраты метаногенов представляют собой конечные продукты жизнедеятельности других бактерий, с которыми метаногенные живут в тесном сообществе. 1-я группа сообщества расщепляет полимеры до мономеров, которые далее сбраживает до H_2 , CO_2 , пропионовой, масляной и других летучих жирных кислот и этанола. Эта группа включает облигатные анаэробные, а также факультативно анаэробные виды. 2-я группа еще мало изученных бактерий превращает большую часть продуктов метаболизма 1-й группы в ацетат. Членов этой группы называют ацетогенными. 3-я группа биоценоза — метаногены, — превращает CO_2 и ацетат в метан. В целом процесс выглядит как превращение 1 М глюкозы в 2,8 М метана и 2,6 М углекислоты:



От сообщества с другими бактериями, поставляющими субстраты метаногенным, выигрывают не только последние. Полнота превращения субстрата и, следовательно, получение энергии первыми двумя группами бактерий зависят от удаления водорода и кислот, так как при этом происходит сдвиг реакции вправо.

Поэтому-то и говорят, что от работы метаногенных бактерий зависит в целом весь процесс анаэробного разложения органических веществ на Земле. Он может происходить и с NO_3^- , с SO_4^{2-} , S^0 как электронными акцепторами, но в их отсутствие зависит от удаления образованного водорода в процессе метаногенеза.

Метаногенные бактерии (особенно гидрогенотрофные)

вступают в непосредственную связь и с анаэробными простейшими. Они обнаружены в гигантской амебе *Pelotuxa palustris*. *Methanobacterium formicum* живет как эндосимбионт сапропелевого *Metopus striatus*. У этого организма нет митохондрий, но есть органеллы, похожие на гидрогеносомы, в тесном контакте с которыми находятся метаногенные бактерии. В гидрогеносомах происходит окисление пирувата до H_2 , CO_2 и ацетата. Метаногенные бактерии удаляют H_2 (участвуя в межвидовом переносе водорода) и служат для простейших, как и в других сообществах, желанными ассоциантами. Они не конкурируют за субстрат, но, удаляя H_2 , делают реакцию термодинамически выгодной.

Так выглядит внешняя сторона жизни метаногенных бактерий в наше время: на душных бескислородных нишах в тесных сообществах с другими формами жизни. Биохимия метаногенеза, по-видимому, не претерпела серьезных изменений в эволюции.

Большой вклад в его изучение внес крупный американский ученый Х. А. Баркер со своими студентами. Основные исследования по биохимии метаногенеза проводились в термофильной *Methanobacterium thermoautotrophicum*, так как она быстро растет (время генерации 1 ч, а у других — много часов и даже недели), ее удастся культивировать в массовой культуре.

Для превращения маленьких молекул в метан природа изобрела особые коферменты. Центральная роль принадлежит коферменту М (Ко-М) (называется так потому, что переносит метильные группы). Он необходим всем метаногенным, обнаружен только у них, у других археобактерий отсутствует. Ко-М — это 2-меркаптоэтансульфоновая кислота ($HS-CH_2=CH_2-SO_3H$) — самый маленький коэнзим. Он служит непосредственным предшественником CH_4 . В переносе C_1 — интермедиатов, кроме Ко-М, участвует метанофуран, метаноптерин. У метаногенов обнаружено четыре новых никельсодержащих фермента, поэтому рост этих бактерий зависит от никеля. Никельсодержащий фактор F_{430} участвует в восстановлении CH_3 -Ко-М до метана. В переносе электронов у метаногенов участвует еще 5-деазарибофлавин, называемый фактором F_{420} . Таким образом, при изучении метаногенных бактерий оказалось, что, кроме НАД и ФАД, в природе есть и другие коэнзимы, вовлекаемые в реакции электронного транспорта. Вместе с тем «вездесущие» убихино-

ны у метаногенов не обнаружены. Предполагают, что восстановление CO_2 до CH_4 происходит через стадии, соответствующие уровню окисления формила, метила, но природа всех интермедиатов пока не установлена. Жизнь метаногенных бактерий характеризуется не только своеобразным способом получения энергии, но и необычным конструктивным метаболизмом. Хотя многие из них — автотрофы, т. е. живут за счет CO_2 , они не фиксируют ее в цикле Кальвина, характерного для большинства фото- и хемотрофных организмов. Нет у них также ферментов серинового и гексулесто-фосфатного циклов, работающих у метилотрофов. Вместо этого функционирует модифицированный обратимый и «разорванный» цикл трикарбоновых кислот. Метаногенные бактерии очень разнообразны. Вариабельность проявляется в отношении последовательности нуклеотидов в 16S рРНК, и дивергенция между группами метаногенов не меньше, чем между видами энтеробактерий, бацилл и цианобактерий. Содержание ГЦ в молекуле ДНК различается от 27,5 до 61 мол. %. Сильно варьирует состав клеточных стенок у представителей разных видов. О чем говорят примеры этого необычайного разнообразия группы? О том, что природа, видимо, допускает отклонения признаков, если они не связаны с затратой лишней энергии и не мешают выживанию вида. Можно полагать, что в период возникновения жизни на древней Земле не было факторов, лимитирующих рост метаногенных бактерий, что не способствовало формированию точности и единообразия в отношении биохимии и биохимических процессов в клетках. Организм с «ошибками» тоже процветал. Но возможно и другое.

Возможно, что мир метаногенов был так же огромен, как и существующий мир истинных бактерий. Многие из промежуточных звеньев либо вымерли, либо ждут своего открытия. И в заключение — о практическом использовании метаногенов.

Биологический метаногенез был известен еще в золотом веке. Во II в. до н. э. китайские историки описывали огонь на болотах. В Китае природный газ использовали для экстракции соли. Метаном, образованным при анаэробном разложении органических отходов в танках, освещали улицы Экзетера в 1893 г., а в 1911 г. в Бирмингеме был построен первый в мире большой завод по анаэробному разложению и стабилизации сточных вод. Газовый генератор превращал метан в электричество, которое да-

вало свет и тепло миллиону жителей города. В США в 30-х годах метан получали из городских отходов и использовали как автомобильное топливо. Сейчас метаногенез переживает свое второе рождение. Мы живем в период постепенного истощения запасов ископаемого топлива, и биологический метаногенез рассматривают как получение дополнительной энергии из возобновленного субстрата с высоким содержанием влаги с одновременным удалением городских, сельскохозяйственных, промышленных органических отходов. Метаногенные бактерии удалось адаптировать к фенольным соединениям, что позволяет шире использовать анаэробное разложение промышленных сточных вод. Метаногенез может происходить при 55—60°, а это важно в тех случаях, когда требуется полное обеззараживание жидких отходов, например на бойнях.

В процессе микробного метаногенеза на Землю возвращается около 80 % энергии, заключавшейся в окисленном субстрате, а остаток после метаногенеза служит хорошим азотным и фосфорным удобрением. В Китае работает более 7 млн. биогазовых установок, в Индии — 75 тыс. гобар-заводов, перерабатывающих навоз («гобар» на языке хинди означает — навоз) и в ближайшие годы там собираются пустить еще 0,5 млн. таких установок. Это неудивительно, если учесть, что в Индии 20 % мирового поголовья коров и буйволов.

Современный уровень глобального метаногенеза при микробиологической активности на земле и в водных экосистемах, превосходит геологическую продукцию метана. Биомасса метаногенных бактерий представляет практическую ценность, так как содержит новые коферменты, которые могут представить интерес для медицины. Препарат КВМ-12 (концентрат метановых бактерий, содержащих витамин В₁₂) используют как витаминную добавку к кормам сельскохозяйственных животных.

* * *

Открытие архебактерий относится к наиболее значительным событиям биологии наших дней. Оно не подтвердило прежнего предположения о происхождении живых существ из бактериального предка, но позволило выдвинуть новую гипотезу о трех (или более) первичных царствах: уркариотов (предков эукариот), архебактерий и

эубактерий. С открытием археобактерий стало ясно, что на уровне прокариотической клетки существуют две формы жизни. Для археобактерий характерно смешение эукариотических и эубактериальных типов организации и функционирования молекулярных машин, причем серозависимые археобактерии по своей молекулярной организации более родственны эукариотической клетке, а метаногены — эубактериям. У археобактерий описано незначительное число видов по сравнению с числом видов у эубактерий. Жизнь археобактерий протекает в условиях, которые, как полагают, превалировали на ранней стадии истории жизни на Земле. По-видимому, они были первыми прокариотными организмами. У археобактерий, видимо, законсервировались исконные черты в связи с особенностями сред их обитания, которые задерживали или даже мешали эволюции бактерий. Действительно, в условиях кипящей воды и экстремальной солености жизненные усилия должны были быть направлены главным образом на сохранение целостности и возможности функционирования таких информационных молекул, как белки и нуклеиновые кислоты. Значит, не исключено, что корни родословных археобактерий так же далеки друг от друга, как и от корней двух других первичных царств, а сходства между археобактериями могут быть и не связаны с их общим происхождением. А это говорит о том, что помещение археобактерий в одно первичное царство может быть весьма произвольным.

Литература

Вилсон А. К. Молекулярные основы эволюции.— В мире науки.— 1985.— № 12.— С. 122—132.

Дуда В. И., Лебединский А. В., Кривенко В. В. Археобактерии в системе царств органического мира.— Успехи микробиологии.— Т. 20.— 1985.— С. 3—38.

Archaeobacteria. Proc. of the 1st Int. Workshop on Archaeobacteria. München, 1981. ed. O. Kandler. Stuttgart N—Y. 1982.

Zillig W., Schnabel R., Stetter K. O. Archaeobacteria and origin of the eukaryotic cytoplasm.

Current Topics in Microbiology and Immunology. v. 114.
Springer — Verlag Berlin — Heidelberg. 1985. p. 1—18.



Е. В. АНАНЬЕВ,
доктор биологических наук,
В. Н. БАШКИРОВ,
кандидат биологических наук

Генетическая инженерия растений: проблемы и перспективы

Мир растений составляет фундамент биосферы планеты, выполняя функцию превращения солнечной энергии в энергию химических связей, которая в конечном счете используется для биосинтеза макромолекул не только растений, но также животных, грибов и микроорганизмов. Свойства растений исключительно многообразны и должны обеспечиваться соответствующим разнообразием структуры генома и отдельных генов. Интерес к проблеме молекулярной организации генома растений постоянно возрастает. Это связано с возможностью выделять гены и служебные последовательности ДНК любого организма с помощью современных методов генетической инженерии. Помимо этого фундаментального направления исследований, призванного объяснить удивительные свойства растений в терминах молекулярной биологии, все реальнее становится разработка методов генетической трансформации растений с использованием клонированных генов. Это позволит решать фундаментальные задачи по изучению механизмов регуляции работы генов и одновременно в корне изменить методику создания новых сортов и разновидностей сельскохозяйственных и других экономически важных видов растений. Однако реализация этой задачи невозможна без детального знания молекулярной организации геномов конкретных видов растений, молекулярных механизмов регуляции работы генов и их взаимодействия в развитии организма. Таким образом, эти два направления работ по генетической инженерии растений развиваются параллельно в тесной взаимосвязи друг с другом. Для выделения структурных генов растений используется весь традиционный арсенал методов генетической инженерии. Наибольшее число геномных копий генов было выделено через этап синтеза кДНК на информационной РНК. Используя метод гибридизации — селекции иРНК на клонах кДНК, проверяют способность иРНК направлять биосинтез нужного полипептида в системе синтеза белка *in vitro*. В первую очередь таким способом были выделены гены, кодирующие богатые клас-

сы иРНК — такие, как, например, гены запасных белков. Затем последовала очередь генов, активность которых индуцируется тепловым или холодовым шоком, анаэробными условиями или патогенными микроорганизмами и, наконец, различных ферментов. К настоящему времени выделено и детально охарактеризовано около сотни различных структурных генов различных видов растений.

Многие структурные гены белков растений кодируются уникальной ДНК. Кодирующую функцию несет около 5—10 % всей уникальной ДНК, что соответствует 15 000—25 000 структурным генам. Значительные успехи в исследовании организации и экспрессии структурных генов белков растений достигнуты исключительно благодаря методам генетической инженерии.

Ряд генов белков растений содержит интроны, фланкированные последовательностями 5' ГТ— и —АГ 3', характерными для большинства интронов эукариотов. Вероятно, сплайсинг у растений и животных осуществляется с использованием одинаковых механизмов, поскольку у тех и у других выделены близкие по структуре семейства мРНК, которые принимают участие в этом процессе. Регуляторные сигналы структурных генов растений типичны для генов, транскрибируемых РНК полимеразой II. На расстоянии 30—60 нуклеотидов до сайта начала синтеза мРНК находятся нуклеотидные последовательности «ТАТА-бокс» или ТАТААТА последовательность, с которых начинается синтез РНК, а на расстоянии 90—180 нуклеотидов ЦЦААТ сигнал, характерный для промоторной области генов эукариот. На 3' конце у большинства генов имеются два сигнала для полиаденилирования РНК — ААТААА, входящих в состав несовершенных палиндромов. Можно сделать вывод, что последовательности, необходимые для инициации и терминации транскрипции и сплайсинга первичных транскриптов, высококонсервативны у растительных и животных геномов.

Часть структурных генов растений представлена различными по составу мультигенными семействами. Сюда относятся гены актинов, гистонов, леггемоглобинов и запасных белков. Гены леггемоглобинов бобовых показывают интересный пример сходства типа организации сходных белков у далеких в эволюционном отношении организмов. Эти белки образуются в клетках клубеньков бобовых и служат для защиты нитратредуктазного ком-

плекса от окисления свободным кислородом. У сои имеется около 10 генов леггемоглобинов, 4 из которых находятся в кластере, а остальные рассеяны по геному. Расположение генов в кластере у бобовых сходно с организацией глобиновых генов у кролика и человека, т. е. три функционирующих гена окружают псевдоген с делецией части структурной области. У бобовых запасные белки подразделяются на 11S-легумины и 7S-компоненты, названные в зависимости от видовой принадлежности конглицинами и фазеолинами. Эти белки являются глобинами и состоят из нескольких субъединиц, кодируемых 2—5 генами. Гены субъединиц легуминов в геноме могут быть сцеплены, как у бобов, или находиться на разных хромосомах, как у сои. 7S белки состоят из трех субъединиц — α , β и γ , кодируемых одним геном с несколькими аллельными вариантами и синтезируемых в виде единого предшественника. Ни у одного из исследованных представителей бобовых не выявлено сцепления генов 7S и 11S классов запасных белков. У злаков запасные белки представлены преимущественно спирторастворимыми проламинами, для генов которых характерны два основных типа организации — рассеянные по геному и кластеризованные. Примером первого типа являются гены зеинов кукурузы, насчитывающие более 20 локусов на хромосомах 4, 7 и 10.

Кластеризованное расположение генов запасных белков наблюдается у пшеницы, ячменя и ржи. Гены проламинов пшеницы — α , β , γ , ω -глиадинов локализованы на коротких плечах хромосом группы 1 и 6, а гордеинов ячменя — на коротком плече хромосомы 5. Эти белки кодируются мультигенными семействами, в состав которых может входить от 20 до 70 копий. В составе кластера на одной хромосоме может находиться от 3 до 10 генов глиадинов пшеницы и до 20—50 генов гордеинов ячменя. Соле-растворимые белки зерна пшеницы — глюteniны состоят из 3 типов субъединиц, кодируемых 2—5 генами, локализованных на длинных плечах хромосом группы 1.

Гены проламинов злаков характеризуются отсутствием интронов в структурной области гена и наличием в регуляторной зоне двойного сигнала для инициации транскрипции. Первая ЦЦААТ — ТАТА последовательность расположена на расстоянии 60—200 нуклеотидов от начала структурного гена, а вторая на расстоянии 700—1100 нуклеотидов. Предполагается, что наличие двойного сигнала для РНК-полимеразы связано с интенсивной

транскрипцией генов запасных белков при созревании эндосперма.

У запасных белков злаков имеется значительный межлинейный полиморфизм по молекулярному весу и числу компонентов, сохраняющийся и на уровне ДНК. По всей вероятности, такой полиморфизм связан с различными аллельными вариантами и комбинациями генов запасных белков. Однако есть данные, что в случаях лектина сои и глютелина пшеницы изменения в спектре запасных белков связаны с встройкой в соответствующий ген транспозоноподобного элемента. Возможно, мобильные элементы растений в какой-то мере определяют наблюдаемый на молекулярном уровне полиморфизм растительной ДНК. Рассмотрение организации и функционирования мобильных генов необходимо для понимания причин изменчивости растительных геномов.

Особый интерес исследователей вызывают те гены, которые свойственны, по-видимому, только растениям. К их числу относятся гены, кодирующие фермент рибулозодифосфаткарбоксилазу (РБФК). Этот фермент состоит из двух субъединиц, большой и малой, и контролирует первый этап фиксации атмосферного углерода, осуществляя реакцию карбоксилирования, а затем гидролиза рибулозо-1,5-дифосфата до 3-глицерофосфата. Этот фермент составляет 50 % растворимого белка зеленых листьев растений. Большая субъединица этого фермента кодируется геном, локализованным в хлоропластной ДНК, а малая субъединица — одним или несколькими генами, локализованными в ядре в зависимости от вида растений. Предшественник малой субъединицы синтезируется в цитоплазме, а при прохождении через мембрану хлоропласта от него отщепляется лидерный олигопептид. Согласно данным Смита и др. (1983), у пшеницы в этом гене имеется всего один интрон, в то время как у табака, по данным Мазра и др. (1985), в этом гене должно быть три интрона. Поскольку среди растений наблюдается выраженное разнообразие по эффективности фиксации атмосферного углерода и эффективности фотосинтеза, то клонирование генов, обеспечивающих эти процессы, позволит в будущем создавать растения, использующие солнечную энергию в максимальной степени.

Существенного прогресса удалось достичь в изучении молекулярной организации мобильных генетических элементов растений, которые были впервые открыты более

40 лет назад Б. Ма-Клинтон. Как известно, мобильные генетические элементы ответственны за явление генетической нестабильности, мутагенез и хромосомные перестройки, которые возникают в результате их транспозиции. Выделить мобильные генетические элементы растений удалось только после того, как были клонированы некоторые структурные гены, которые повреждаются мобильными элементами при их встраивании. Из генома кукурузы выделено несколько хорошо изученных генетических мобильных элементов, таких, как Ac и Ds (Штарлингер и др. 1981, Федоров и др. 1983), Mu-1 (Баркер и др., 1984.), Spm (Сэдлер и др., 1985). Как правило, мобильные генетические элементы повторены в геноме и образуют гетерогенные семейства, члены которых диспергированы по хромосомам. Большая часть членов каждого семейства являются дефектными копиями и не кодируют какой-либо функции, хотя могут сохранять способность к перемещению при наличии в клетке транспозазы. Функциональная копия мобильного элемента — это, как правило, участок ДНК размером в несколько тысяч пар оснований, ограниченный инвертированными повторами, которые почти идентичны. Внутренняя часть элемента кодирует фермент транспозазу. Этот фермент специфически взаимодействует с концевыми повторами элемента и может вырезать его из хромосомы. Вырезание может происходить точно с восстановлением исходной структуры участка ДНК и неточно, т. е. с делециями или вставками от одного до нескольких нуклеотидов. Это приводит к появлению стабильных мутаций и является одним из механизмов создания новых последовательностей ДНК. Встраивание элемента в хромосомы сопровождается дубликацией сайта интеграции ДНК. Изучение нормальных и мутантных генов растений позволило обнаружить еще несколько видов мобильных генетических элементов и у других видов растений. Хотя копии дефектных мобильных элементов обнаруживаются практически у всех линий растений одного вида, тем не менее геном растений высоко стабилен. По-видимому, появление активного мобильного элемента — событие достаточно редкое. Если сами мобильные элементы были выделены с помощью уникальных генов, то в настоящее время предложен метод выделения любых структурных генов с помощью мобильных элементов. Если какой-либо ген инактивирован или поврежден в результате инсерции мобильного элемента, то этот ген можно

выделить из геномной библиотеки фрагментов ДНК, используя в качестве зонда сам мобильный элемент. Таким образом Сэдлер и др. (1985) выделили ген A1, а Федоров и др. (1985) — ген bz из генома кукурузы. Возможно, мобильные генетические элементы найдут применение в качестве векторов для генетической трансформации растений, как это было сделано в случае Р-фактора у дрозофилы в работе Рубина и Спрадлинга (1981).

В геноме растений имеется множество классов повторяющихся последовательностей ДНК. Часть этих последовательностей кодирует определенные типы РНК, как, например, 18S, 28S и 5S РНК. Они собраны в кластеры на хромосомах, состоящие из нескольких сот или тысяч tandemно расположенных копий генов. У растений выделено несколько семейств последовательностей ДНК, которые преимущественно сконцентрированы в теломерных районах хромосом, хотя часть копий может быть рассеяна и по всему геному. Флавелу (1980) удалось выделить несколько семейств таких нуклеотидных последовательностей из генома ржи. Аналогичные последовательности были обнаружены в геноме пшеницы и кукурузы. Интересно, что даже у близкородственных видов растений число и состав таких семейств могут сильно изменяться, что указывает на их эволюционную нестабильность. Однако основная часть повторяющихся последовательностей многих растений, например злаков, диспергирована по геному, и на их долю приходится больше половины всей геномной ДНК. Поскольку большая часть этих семейств ДНК также нестабильна в эволюции (Ананьев и др., 1986), то высказывается предположение, что их можно рассматривать как еще один класс мобильных элементов генома растений, по своим признакам больше напоминающих ретропозоны, которые обнаружены в геноме животных. На основе повторяющихся нуклеотидных последовательностей можно выделить отдельные семейства, которые обладают выраженным межсортовым полиморфизмом по структуре рестриктных фрагментов ДНК, что позволяет использовать их в качестве маркеров в генетическом анализе.

Уже давно было установлено, что многие свойства растений определяются генами, которые локализованы в ДНК хлоропластов и митохондрий. К их числу относятся цитоплазматическая стерильность, свойство, которое широко используется на практике, устойчивость растений

к некоторым гербицидам, например атразину, устойчивость к антибиотикам, способность к фотосинтезу. В составе хлоропластов обнаруживается кольцевая двухцепочечная ДНК размером от 130 до 200 тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.) в зависимости от вида растений. Если взять для примера хлоропластный геном злаков (размер — 130 т. п. н.) (Поулсен, 1983), то он содержит два больших инвертированных повтора размером 22,5 т. п. н., внутри которых располагаются гены для рибосомных 16S 23S и 5S РНК. Такие же повторы встречаются и в хлоропластной ДНК многих других видов растений. Гены транспортных РНК, число которых приближается к 30, рассеяны по хлоропластному геному. По крайней мере некоторые из них имеют интроны. Хлоропластный геном кодирует около 100 полипептидов, гены которых, так же как и ядерные гены, могут содержать интроны. Однако их информационная РНК не полиаденилируется. Работа определенной части хлоропластных генов индуцируется светом. Многие полипептиды, которые обнаруживаются в хлоропластах, кодируются ядерными генами. Часто встречаются мультимерные белковые комплексы, состоящие из полипептидных цепей, часть которых кодируется хлоропластным, а часть — ядерным геномом. Митохондриальный геном высших растений по размеру значительно больше, чем митохондриальный геном других организмов и варьирует от 200 до 2400 т. п. н. Например, у кукурузы его размеры достигают 570 т. п. н. (Лонсдейл, 1984). В митохондриях обнаруживается одна большая кольцевая молекула ДНК, соответствующая по размеру геному. В составе этой ДНК имеются повторяющиеся нуклеотидные последовательности, на долю которых приходится до 10 % всей ДНК. Предполагается, что они являются сайтами гомологичной рекомбинации. Это приводит к образованию популяции маленьких кольцевых или линейных субгеномных молекул ДНК или линейаризации большой кольцевой ДНК. В составе мтДНК идентифицировано по крайней мере 20 структурных генов, кодирующих полипептиды, которые синтезируются в митохондриях, а также гены рибосомных 16S, 26S и 5S РНК и гены транспортных РНК. Однако большая часть белков митохондрий, так же как и хлоропластов, кодируется ядерными генами. Неоднократно высказывалось предположение, что митохондрии и хлоропласты являются потомками первичных симбиотических прокариотов. На это указывает сходство в структуре

генов рДНК. Как возникла система взаимодействия генов хлоропластов и митохондрий с ядерным геномом, пока не ясно. Однако предполагают, что между ними мог происходить обмен генетической информацией. На это указывает тот факт, что в геноме хлоропластов и митохондрий обнаруживаются области достаточно выраженной гомологии. Например, у кукурузы найдено, что в митохондриальной ДНК есть нуклеотидные последовательности, гомологичные гену большой субъединицы РБФК. Более того, у шпината найдены области гомологии между ядерным и хлоропластными геномами. В настоящее время становится актуальной задача определения первичной нуклеотидной последовательности хлоропластного и митохондриального геномов.

Проблема генетической трансформации растений в настоящее время находится в стадии модельных разработок и поисков наиболее оптимальных путей переноса в растения чужеродной генетической информации, хотя первые попытки трансформировать растения были сделаны еще в 60-е годы.

Главный вопрос состоял в том, как ввести ДНК клонированных генов в геном растения и как обнаружить растения-трансформанты. Все первые попытки ввести ДНК в клетки растений путем замачивания семян и пыльников в растворах ДНК, инъекций растворов ДНК в ткани растений оказались несостоятельными.

Первый прорыв в решении этой проблемы удалось совершить лишь после того, как был выяснен молекулярный механизм опухолеобразования у растений. Основной вклад в решение этой проблемы внесли Шелл, Монтегю и др. Было обнаружено, что некоторые виды почвенных бактерий вызывают образование опухолей у двудольных растений за счет перестройки метаболизма клеток растений. Эта перестройка достигается за счет генетической трансформации растительной клетки особым сегментом ДНК, так называемой Т-ДНК, которая находится в составе большой бактериальной плазмиды (Ti-плазмиды 200 т. н. п.). Процесс переноса находится под контролем генов вирулентности, локализованных как в Ti-плазмиде, так и в хромосомной ДНК бактерии. Гены вирулентности Ti-плазмиды индуцируются фенольным соединением, которое присутствует в выделениях поврежденных живых клеток растений (4-ацетил — 2,6-диметоксифенол). В Ti-плазмиде Т-ДНК ограничена почти идентичными прямыми

повторами размером в 25 н. п., причем существенным для переноса Т-ДНК является только правый повтор, с которого и начинается перенос одной цепи Т-ДНК из клетки бактерии в клетку растения при их конъюгации. Однони-тевая Т-ДНК обнаруживается в свободном состоянии. Каким образом и в какой форме Т-ДНК попадает в ядро и какие механизмы обеспечивают ее интеграцию в хромо-сомную ДНК, пока не ясно.

В состав Т-ДНК входят гены вирулентности, гены, конт-ролирующие биосинтез гормонов и октопин или нопалин-синтазы. Экспрессия в растительной клетке генов, контро-лирующих биосинтез гормонов, вызывает разрастание тка-ней и образование опухолей. Продукты генов биосинтеза опинов используются бактериями в качестве источника азота и углерода.

Использовать целиком Тi-плазмиду в качестве вектора невозможно ввиду ее большого размера (200 т н. п.) и возникающих из-за этого трудностей при ее выделении и проведении генно-инженерных манипуляций. Поэтому были созданы производные Тi-плазмиды, в которых гены Т-ДНК, отвечающие за опухолеобразование, были удале-ны из Т-ДНК и замещены на ДНК-плазмиды рВR322 при сохранении концевых повторов Т-ДНК. Все работы по конструированию рекомбинантных ДНК проводятся на *E. coli* в плазмиде рВR322, которая затем вводится в агро-бактерий с помощью конъюгации. За счет гомологичной рекомбинации по нуклеотидным последовательностям рВR322 получают Тi-плазмиду, в которую встроены нуж-ные гены. Далее их перенос в клетки растений осуше-ствляется обычным способом, характерным для Т-ДНК.

Другой прием основан на использовании бинарных векторов. Клонирование производят в рекомбинантной плазмиде, которая содержит фланговые последователь-ности Т-ДНК и способна к репликации как в *E. coli*, так и в *A. tumefaciens*. Для переноса интересующей после-довательности в этом случае нужна плазида-помощник. В качестве помощника используют Тi-плазмиду, сохра-нившую *vir*-область, но с делецией района Т-ДНК. Плаз-мида с клонированным геном передается конъюгацией из *E. coli* в штамм *A. tumefaciens* с Тi-плазмидой-помощ-ником. Перенос гена, фланкированного фрагментами Т-ДНК, обеспечивается *vir*-областью плазмиды-помощни-ка. В качестве плазмиды-помощника может быть приме-нена и обычная Тi-плазида без делеции. Поскольку ис-

пользовать растительные гены в качестве маркеров трансформации не представлялось возможным, исследователи столкнулись с необходимостью работать с бактериальными генами устойчивости к антибиотикам. Однако бактериальные гены могут экспрессироваться, только будучи подстроеными под соответствующие сигналы начала транскрипции и стоп-сигналы. В настоящее время методами генетической инженерии создан ряд химерных генов, в которых сигналами начала транскрипции служат промоторы: 1) генов опинов *Ti*-плазмид *A. tumefaciens*; 2) промотор гена VI вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК); 3) промотор гена малой субъединицы рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазы; 4) промотор гена протеина, связывающего хлорофилл *a/b*. Наибольшее распространение в используемых генетических конструкциях получили первые две последовательности. В качестве маркеров в векторах для трансформации растений были использованы: 1) ген аминогликозидфосфотрансферазы *II* (АГФТ *II*) из *Tp 5 E. coli*, который обеспечивает устойчивость к антибиотикам аминогликозидного ряда (неомицину, канамицину, G 418); 2) ген хлорамфениколацетилтрансферазы из *Tp 9 E. coli* обеспечивает устойчивость к хлорамфениколу; 3) ген дигидрофолатредуктазы (ДГФР) из *Tp 7 E. coli* обеспечивает устойчивость к метотрексату. Растительные клетки высокочувствительны к этим агентам, что позволяет применять селективные системы на основе этих антибиотиков для отбора трансформантов.

Таким образом, в руках исследователей появились удобные векторы, что позволило приступить к основательной разработке методов генетической трансформации. В настоящее время в этой области наметились существенные сдвиги и прямо на наших глазах появляются новые приемы переноса чужеродных генов в растительные клетки, а эффективность старых подходов постоянно растет.

С помощью системы переноса Т-ДНК уже проведены десятки удачных экспериментов как на целых растениях, так и на культуре протопластов. На табаке и петунии было получено потомство растений-трансформантов, которые стабильно наследовали признак устойчивости к канамицину по аутосомно-доминантному механизму в соответствии с Менделевскими закономерностями. Однако круг хозяев этих микроорганизмов ограничен видами двудольных растений. Подавляющее большинство однодольных

видов, включая и ценные в практическом отношении виды семейства злаковых, не поражаются агробактериями. Правда, имеются данные, что такие представители однодольных, как лилия, нарцисс и спаржа, по-видимому, могут быть заражены агробактериями. Совсем недавно А. С. Ф. Грэйвс и С. Л. Гольдман (1986) получили данные о возможности инфекционного процесса, вызываемого агробактериями, у кукурузы. Вероятно, в будущем разработка новых методик даст возможность существенно расширить круг хозяев агробактерий. Однако пока невозможность распространения этого подхода на многие растительные объекты стимулирует разработку других методов генетической трансформации.

К их числу относится так называемое прямое введение ДНК в протопласты. Этот метод пригоден для работы с протопластами любых видов растений. Впервые успешно он был применен Ф. А. Кренсом с соавторами в 1982 г. При разработке этого метода авторы исходили из предположения, что условия, применяемые в генетике соматических клеток растений для слияния протопластов с помощью полиэтиленгликоля, будут способствовать проникновению ДНК в клетки. Для отбора трансформантов использовали то обстоятельство, что клетки опухолей, индуцируемых Ti-плазмидой, способны давать каллусы на средах без добавления фитогормонов. Наличие Т-ДНК в трансформированных клетках было подтверждено измерением лизопиндегидрогеназной активности и с помощью блоттинг-гибридизации. Позже был осуществлен перенос бактериального гена канамицин-устойчивости в протопласты табака. Из устойчивых к канамицину каллусов были получены взрослые растения. Наличие в геноме растений бактериального гена было подтверждено блоттинг-гибридизацией, а также постановкой проб на активность АГФТ II в грубых экстрактах из листьев. Полученные растения-трансформанты передавали своему потомству бактериальный ген как доминантный маркер в соответствии с законами Менделя. Успешные опыты по трансформации были проведены и на других видах. И. Потрикус и др. (1985) осуществили трансформацию протопластов итальянского райграсса *Lolium multiflorum* химерной последовательностью, в которой ген устойчивости к канамицину был подстроен под промотор гена VI вируса мозаики цветной капусты. Х. Лёрц с соавторами (1985) провели успешный перенос гена устойчивости к канамицину в протопласты

одного из видов пшеницы *Triticum monosocum*. Х. Учмия и др. (1986) трансформировали плазмидой с геном АГФТ 11 протопласты риса. Эффективность трансформации в различных экспериментах, проведенных разными авторами, была примерно одинакова и составляла 10^{-4} — 10^{-5} . Несколько особняком выделяется работа группы Дж. Шелла по трансформации протопластов табака гибридной конструкцией, где ген АГФТ 11 был подстроен под нопалиновый промотор. В этом случае в качестве агента, усиливающего проницаемость мембран, был применен поливиниловый спирт в сильнощелочной среде ($\text{pH}=10,0$). Препарат ДНК вводился в виде копреципитата с фосфатом кальция. Частота трансформации при этом методе также составляла 10^{-4} — 10^{-5} .

Хотя метод инкубации с протопластами хорошо разработан, однако ряд исследователей пошли по пути дальнейшего улучшения его. В целях оптимизации условий проникновения ДНК в протопласты в нескольких лабораториях стали применять электрический пробой клеточных мембран. Разные авторы используют различные среды для электроинъекции ДНК, но, как правило, в среду входит маннит в концентрации 0,2—0,5 М. Протопласты помещают в среду для электроинъекции, добавляют в нее препарат ДНК, некоторое время инкубируют и переносят в кювету, в которую вмонтированы электроды. Большинство исследователей применяют кратковременные разряды большой напряженности (1—2 кв. см). Одними из первых начали применять электрошок для трансформации И. Потрикус с соавторами. Трансформацию проводили на протопластах табака с помощью плазмиды, несущей ген устойчивости к канамицину, подстроенный под промотор гена VI ВМЦК. Авторы показали, что эффективность трансформации при применении электроинъекции очень высока — 10^{-2} — 10^{-3} . Однако у большинства других исследователей эффективность трансформации была ниже на один-два порядка.

Интересно, что при прямом проникновении ДНК в протопласты как с применением электрошока, так и без него в геном клетки довольно часто интегрирует не одна, а несколько копий вводимой плазмиды. Но поскольку наследование бактериальных маркеров у потомства трансформантов происходит по моногенному механизму, то был сделан вывод, что несколько копий встраивается единым блоком в один хромосомный сайт. При этом, по-видимому,

не все копии бактериального гена активны, а лишь часть их, так как многие исследователи отмечают отсутствие связи между числом встроившихся копий и устойчивостью к антибиотикам. Ч. Д. Риггс и Дж. В. Бэйтс (1986) провели анализ нескольких десятков трансформированных растений табака и обнаружили, что интегрированные в геном растения копии плазмиды нередко бывают пере-строены. Часто они наблюдали конкатомерные блоки, причем обоих типов: «голова к голове» и «голова к хвосту». Таким образом, предположение о встраивании в геном растений нескольких копий получило подтверждение на молекулярном уровне.

Поскольку из культуры протопластов далеко не всегда можно регенерировать целое растение, то желательно распространение столь перспективной методики, как электроинъекция на клетки каллуса или целого растения. Некоторые шаги в этом направлении уже делаются. Так, Х. Морикава с сотрудниками (1986) осуществили с помощью методики электроинъекции введение РНК вируса табачной мозаики в интактные клетки табака. Особенно перспективно применение этого метода на такой системе, как клетки зрелой пыльцы.

Не прекращаются попытки введения ДНК в клетки растений путем инъекции. Гуан-ю Жу и др. (1983) вводили с помощью шприца в завязь хлопчатника ДНК близких видов. ДНК вводили в виде комплекса с гистонами тимуса теленка. В этих опытах значительное число полученных после обработки растений (иногда более половины) имело отдельные признаки донора ДНК. Интересно, что в первом поколении частота растений, имеющих признаки донора, была ниже, чем в последующих. В некоторых опытах значительное число растений, полученных из семян, прошедших обработку, было стерильным. А. де ла Пена и Х. Лёрц (1986) опубликовали краткое сообщение о попытке ввести бактериальный ген устойчивости к канамицину путем инъекции ДНК плазмиды в развивающиеся соцветия ржи. Отбор семян, трансформированных по этому маркеру, проводили, проращивая их на плотных средах с добавками канамицина. Такие растения были получены, и их изучение продолжается.

Инъекция растворов ДНК непосредственно в клетки или ядра клеток растений — задача более сложная, но, исходя из опыта, полученного на клетках животных, А. Кроссвей и др. (1986) применили метод микроинъек-

ции в протопласты мезофилла табака ДНК-плазмиды, переносимой ген устойчивости к канамицину. С помощью микрокапилляра в клетки вносили 2 пиколитра раствора ДНК. После этой процедуры выживало 50—90 % клеток. Частота трансформированных протопластов на основе данных блоттинг-гибридизации составляла: при уколе в ядро — 14 %, при уколе в цитоплазму — 6 %. Интересно, что при микроинъекциях ДНК в клетки животных введение микрокапилляра в ядро в 100 раз более эффективнее укола в цитоплазму. В случае растительных клеток разница между этими двумя способами введения ДНК в клетку не столь высока. По данным этих опытов в геном встраиваются небольшие куски вводимой плазмиды. Лишь половина всех трансформантов имела 1—2 копии плазмиды, остальные содержали куски плазмиды разной величины.

Метод обработки пыльцы растворами ДНК в последнее время широко не применялся, и с его помощью разными исследователями получены данные, которые противоречат друг другу. Дж. С. Сэндфорд и др. (1985) попытались трансформировать при помощи этого метода растения кукурузы и томатов. В качестве реципиентов были взяты линии растений, маркированные рецессивными аллелями генов окраски плодов (у томатов) и зерновых (у кукурузы). Трансформацию проводили геномными ДНК-линиями с доминантными аллелями этих генов. В раствор, содержащий до 15 % сахарозы, вносили пыльцу и ДНК. Во время инкубации раствор аэрировался. Авторами было просмотрено свыше 4 тысяч потенциальных трансформационных событий на томатах и примерно 1 тысяча таковых на кукурузе. Достоверных результатов не получено. В работе Ота (1986) на линиях кукурузы, подобных тем, с которыми экспериментировали Сэндфорд с соавторами, трансформация проводилась геномными ДНК. На рыльца наносилась паста из пыльцы, приготовленная на растворе ДНК в 0,3 М сахарозе. Частота трансформации, которая оценивалась по появлению растений с признаками донора ДНК, по данным Ота, варьировала от 1 до 10 %. Часть растений, выращенных из трансформированных семян, была стерильна. Отмечалось появление мозаиков. Некоторые растения с признаками донора были обнаружены в потомстве растений, которые были целиком похожи на реципиента. Молекулярная характеристика трансформантов не проведена.

Разработка векторов на базе вирусов растений пока не получила широкого распространения из-за ограниченного круга хозяев. Однако у этого метода есть то преимущество, что функция доставки чужеродного гена в растительную клетку здесь осуществляется вирусом. Пока что в качестве единственного примера можно привести работы по созданию векторов на базе вируса мозаики цветной капусты, с помощью которых можно вводить нужные последовательности ДНК в растения, относящиеся к семейству крестоцветных. Н. Бриссон и др. (1984) вшивали в район ORFII ВМЦК бактериальный ген дигидрофолатредуктазы. Такая модификация вирусного генома не влияла на инфекционность, поэтому трансформацию можно было проводить путем втирания рекомбинантной ДНК в лист. После заражения растений турнепса из них была выделена ДНК и обнаружена плазмидная последовательность. Наличие продукта гена ДГФР было подтверждено иммуноблоттингом. Устойчивость к метотрексату проверяли, опрыскивая растения соответствующим раствором, а также постановкой проб в грубых экстрактах листьев, где смотрели включение фосфорной метки во фракцию ДНК в присутствии метотрексата. Е. Пашковски с соавторами (1986) встроили на место гена VI ВМЦК бактериальный ген устойчивости к канамицину. Такой вирусный геном не был способен к инфекции, и заражение проводили в присутствии вируса-помощника. Инокулировали как целые растения турнепса, так и заражали культуру протопластов. Перенос гена устойчивости к канамицину был подтвержден как блоттинг-гибридизацией, так и измерением активности АГФТ II. В случае протопластов чужеродная ДНК в трансформированных клонах все еще обнаруживалась спустя год. Недавно появилось краткое сообщение о разработке вектора для трансформации злаковых растений на основе вируса карликовой мозаики пшеницы.

Д. А. Соммерс и др. (1986) применили слияние протопластов в целях переноса генетической информации. Протопласты табака с мутантным аллелем нитратредуктазы сливали с протопластами ячменя с нормальным аллелем этого гена. Протопласты ячменя перед слиянием обрабатывали высокими дозами γ -излучения. После слияния протопласты переносили на среду, где единственным источником азота были нитраты. Наличие нитратредуктазного гена ячменя в геноме табака было подтверждено измере-

нием нитратредуктазной активности и иммунологическими методами. Сходные эксперименты были проведены Д. Дудитсом и др. (1986), в которых устойчивость к метотрексату и 5-метилтриптофану передавалась от протопластов моркови протопластам табака. Дж. В. Бэйтс и др. (1986) в целях повышения эффективности этого метода применили электрошок для облегчения процесса слияния протопластов.

Более перспективны методы слияния протопластов растений со сферопластами бактерий. Впервые такой метод применили С. Хазезава и др. (1981). Они сливали протопласты *Vinca rosea* со сферопластами *A. tumefaciens*, несущими Ti-плазмиду октопинового типа. Протопласты и сферопласты смешивали в соотношении 1:100 и 1:1000. Для индукции слияния применяли полиэтиленгликоль или поливиниловый спирт. После слияния протопласты переносили на среду без фитогормонов. Колонии, выросшие на этой среде, должны были содержать Т-ДНК. Наличие Т-ДНК подтвердили тестом на наличие октопина. Общее число полученных каллусов было больше числа октопин-синтезирующих колоний. Частота трансформации в этих опытах была 10^{-4} — 10^{-5} . В работе Н. Танаки с соавторами (1984) сливали протопласты капусты со сферопластами *E. coli*, несущими рекомбинантную плазмиду, в составе которой был ген ВМЦК. Проникновение вирусного генома в клетки наблюдали на цитологических препаратах, обработанных антителами против ВМЦК с флуоресцентной меткой. Оптимальным соотношением протопластов и сферопластов, по данным авторов, было 1:1000. При этом соотношении 8 % клеток давали флуоресцентное окрашивание. Просто смесь протопластов и сферопластов, взятая в качестве контроля, не давала такого окрашивания.

Таким образом, арсенал методов генетической инженерии растений велик, многие методы детально разработаны и могут быть широко применены на различных растительных объектах. Эти методы требуют лишь небольших доработок применительно к конкретным видам растений. В настоящее время генетическая инженерия растений переходит от теоретических исследований к практическим разработкам. Первые шаги в этом направлении уже сделаны. Так, Л. Комаи и др. (1985) ввели в геном табака ген *aro A* *Salmonella typhimurium*, который повышает устойчивость к гербициду глифосату. В фирме Plant Genetic System (Бельгия) в геном табака интегрирован

ген токсина *Bacillus thuringiensis*, который дает устойчивость ко многим видам насекомых. И. Потрикус и др. (1985) ввели в клетки табака ген запасного белка кукурузы.

В заключение можно отметить, что современная генетика растений опирается на совокупность мощных методов традиционной генетики, генетической и клеточной инженерии растений. Это уже позволило вскрыть многие принципиальные вопросы организации и функционирования генома растений и разработать методы генетической трансформации. Однако создание теории организации и функционирования генома растений потребует еще больших усилий. Вместе с тем эти усилия будут не напрасны и направлены не только на получение фундаментальных знаний о природе наследственности растений, но также и на их практическое использование. В настоящее время уже решаются задачи по введению в геном растений отдельных генов, которые могут позволить защитить растения от патогенов, вредителей и гербицидов, улучшить качество растительного белка. В ближайшем будущем встанет проблема модификации более сложных функций растений, таких, как фотосинтез, фиксация атмосферного азота и устойчивость к стрессам. Векторы второго поколения позволяют вводить в геном генные конструкции, которые будут обеспечивать биосинтез определенных соединений, например, сахаров, углеводов, аминокислот, витаминов, жиров, алкалоидов и углеводородов. Наконец, в отдаленной перспективе, возможно, удастся разработать такие генные конструкции, которые позволят эксплуатировать дикие виды растений, приспособленные к экстремальным факторам окружающей среды, за счет придания им желательных свойств. Решение этих проблем позволит снизить уровень загрязнения окружающей среды, энергозатраты на получение сельскохозяйственной продукции и повысить общий уровень эффективности использования различных регионов Земли.

Литература

- Пирузян Э. С., Андрианов В. М. Плазмиды агробактерий и генетическая инженерия растений.— М.: Наука, 1985.— С. 279.
Созин А. А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции.— М.: Наука, 1985.— С. 218.
«Genetic Flow in Plants», B. Hohn and E. S. Dennis, eds., New York, Springer Verlag, 1985, pp. 253.



В. И. ДУДА,
доктор биологических наук

Новые формы анаэробных бактерий: расширение горизонтов биотехнологии

На протяжении всей истории развития микробиологии успехи в изучении анаэробных микроорганизмов вносили большой вклад в биологию, кардинально изменяя общую картину мира живых существ, концепции о возникновении и эволюции жизни на Земле, ее энергетических основах, роли микроорганизмов в биосфере, инфекционных заболеваниях человека и животных. От накопления фундаментальных знаний в этой области, пополнения природного микробного генофонда в коллекциях, лабораториях зависело использование анаэробов в практической деятельности человека, а в настоящее время зависит прогресс в развитии ряда разделов биотехнологии.

Бесспорно, крупнейшим вкладом в биологию было открытие Луи Пастером в 1861 г. облигатно анаэробных микроорганизмов, т. е. организмов, не только не требующих молекулярного кислорода для своей жизнедеятельности, но и боящихся его. Эти данные разрушили, как известно, представления биологов того времени о невозможности жизни без кислорода. Однако вначале анаэробы воспринимались как какие-то диковинки, исключения в огромном мире живых организмов.

Следующим важным этапом в развитии микробиологии было получение большого фонда научных знаний и доказательств того, что анаэробные микроорганизмы весьма разнообразны и широко распространены в природе. Они принимают важное участие в круговороте веществ на Земле, формировании биосферы и атмосферы. Параллельно сравнительно-биохимические исследования вскрыли относительную примитивность метаболизма анаэробов. Эти данные сыграли важную роль в формировании А. И. Опариным в 1924 г. концепции о происхождении жизни на Земле, становлении и эволюции первичных живых организмов (протобионтов), за прообраз которых были взяты клостридии — гетеротрофные анаэробы, широко распространенные в настоящее время в природе.

Третье крупное событие в биологии — это открытие в конце 70-х годов нового мира (на языке таксономистов —

нового «царства») — архебактерий [1] (см. первую статью настоящего сборника).

Необходимо подчеркнуть, что в открытие «царства» архебактерий решающий вклад внесло изучение одной из уникальных групп облигатных анаэробов — метанообразующих бактерий (или метаногенов). Именно анализ первичной структуры и состава 16S-рибосомальных РНК этих бактерий позволил Вузу и Фоксу в 1977 г. сделать вывод о существовании новой особой в эволюционном отношении группы микроорганизмов [2].

К этому времени микробиологи уже имели в руках достаточное разнообразие форм метаногенов, чтобы можно было сделать обоснованные обобщения об этой группе. Уже было известно, что эти бактерии являются весьма необычными и удивительными по своим свойствам. Во-первых, являясь строгими анаэробами, только они способны некоторые простые органические вещества (ацетат, метанол, формиат) или CO_2 и H_2 трансформировать до метана. Во-вторых, им свойствен ряд уникальных кофакторов (например, коэнзим М-2 — меркаптоэтанолсульфоновая кислота). В-третьих, их клеточные стенки состоят не из муреина (как у большинства эубактерий), а из ряда иных биополимеров. В-четвертых, метаногенам свойственны уникальные липиды (составные части мембран), не встречающиеся у обычных бактерий.

Однако следует учесть, что метанообразующие бактерии очень чувствительны к молекулярному кислороду и работа с ними представляет один из самых трудных видов микробиологических работ, требующих применения специфических методов, особого оборудования, большого опыта работы и мастерства. Но именно к середине 70-х годов произошел резкий скачок в анаэробной технологии и оборудовании микробиологических лабораторий, обеспечивших получение достаточного разнообразия чистых культур метанообразующих бактерий.

Современная микробиологическая анаэробная технология основывается на четырех методических принципах:

- 1) вся микробиологическая работа с культурами — от посева до посева — должна осуществляться полностью в анаэробных условиях;

- 2) отбор, хранение и обработка проб также должны осуществляться в условиях, не допускающих контакта с молекулярным кислородом;

- 3) высев образцов и культур должен осуществляться

на предварительно восстановленные среды. Термическую стерилизацию сред необходимо проводить в отсутствие молекулярного кислорода, с тем чтобы в средах не образовывались перекисные соединения и супероксидные радикалы;

4) ряд биохимических исследований анаэробных микроорганизмов, особенно при изучении их ферментов, коэнзимов, мембран, должны также выполняться в строго анаэробных условиях.

В настоящее время имеется арсенал совершенных методов и оборудования для культивирования анаэробов как в жидких, так и в плотных питательных средах. Кроме того, разработаны сложные методы инкубирования анаэробных микроорганизмов в ферментерах в виде проточных культур, что позволяет получать достаточное количество биомассы и метаболитов для исследовательских целей и разработки лабораторных моделей будущих промышленных технологических процессов.

В основе методов получения жидких культур анаэробов лежат пионерные разработки Хангейта, сутью которых являются: а) работа с организмами в токе нейтрального газа или смеси газов, очищенных от кислорода; б) эффективная очистка газов с помощью высокоэффективных катализаторов реакции кислорода и водорода. В качестве таковых используется гранулированная медь (при температуре $\sim 340^\circ$) или гранулированный палладий.

Для пересевов и культивирования анаэробов на плотных питательных средах разработаны и выпускаются различными фирмами специальные сложные анаэробные боксы и камеры, атмосфера в которых очищается от O_2 с помощью палладиевого катализатора, а материалы подаются в камеры с помощью шлюзов.

Широкое использование этих методов привело к обнаружению за последнее десятилетие большого числа новых форм анаэробных микроорганизмов, обладающих новыми, неизвестными ранее свойствами — в плане физиологии, биохимии, генетики, морфологии и цитологии. Однако стимулятором открытия новых видов анаэробных микроорганизмов выступает не только прогресс в методах исследования, но и запросы практики, расширяющиеся перспективы практического использования анаэробов в народном хозяйстве и медицине.

Особенно ярко видно резкое возрастание фонда сведений и количества новых форм на примере с экстремально

термофильными и неспорообразующими анаэробными бактериями — зубактериями и архебактериями. Хотя выделен ряд новых видов спорообразующих термофилов, особенно поразительны успехи с получением и описанием новых неспорообразующих термофильных анаэробов, даже на уровне такого высокого ранга таксонов, как род. Вся группа экстремально термофильных зубактерий, насчитывающая 11 родов, была описана за последние 7—8 лет. До 1979 г. они не были известны ученым. Между тем эти удивительные прокариоты, способные развиваться при очень высоких для жизни, но оптимальных для них температурах (от 65 до 105 °C), привлекают к себе все большее внимание ученых во многих лабораториях мира в связи с перспективами практического использования их активности и продуктов обмена веществ. Предельными оптимальными значениями температуры для роста известных в настоящее время зубактерий является температура 80—85 °C, а архебактерий — 105 °C.

Среди экстремально-термофильных анаэробных зубактерий можно выделить две группы организмов — грамположительные (фирмикутные) и грамотрицательные (грациликутные) формы. Ранее под этими терминами подразумевалась реакция на окраску по методу Грама. В настоящее время становится ясным, что между этими двумя группами бактерий имеются глубокие различия, выражающиеся в тонкой организации их клеток и эволюции. Так, клетки грамотрицательных бактерий в отличие от грамположительных обладают двумя дополнительными клеточными структурами, имеющими существенное значение для их жизнедеятельности, а именно: наружной мембраной и периплазматической зоной, расположенной между цитоплазматической и наружной мембранами (рис. 3). Известно, что наружная мембрана выполняет несколько важных функций: она является барьером проницаемости для входа и выхода из клетки веществ, на ней расположены рецепторы для фагов, к ней прикрепляются фимбрии и жгутики, в ней локализованы некоторые гидролитические ферменты, липополисахариды, антигены. Наконец, наружная мембрана находится в тесном контакте с муреиновым слоем и составляет с ним единую структуру — клеточную стенку. Интересно отметить, что структуры, подобной наружной мембране, нет ни у других эволюционных групп прокариот, ни у эукариот. Уникальные функции осуществляет периплазматическая зона. Благодаря тому

что она находится в пространстве между двумя мембранами, в ней «заперты» некоторые ферменты и акцепторные белки; в связи с этим она выполняет трофическую и транспортные функции. В этой зоне у спирохет расположены аксиальные нити. В процессе эволюции периплазматическая зона грамотрицательных бактерий стала специфической экологической нишей для паразитирующих бактерий рода *Bdellovibrio*, которых так и называют — периплазматические паразиты.

С отмеченными цитологическими особенностями грамотрицательных бактерий коррелирует ряд их существенных физиолого-биохимических свойств. Поэтому по предложению известных систематиков Гиббонса и Мюррея (1978) для обозначения этих бактерий применяют термин «грациликуты». Грамположительные бактерии, не обла-

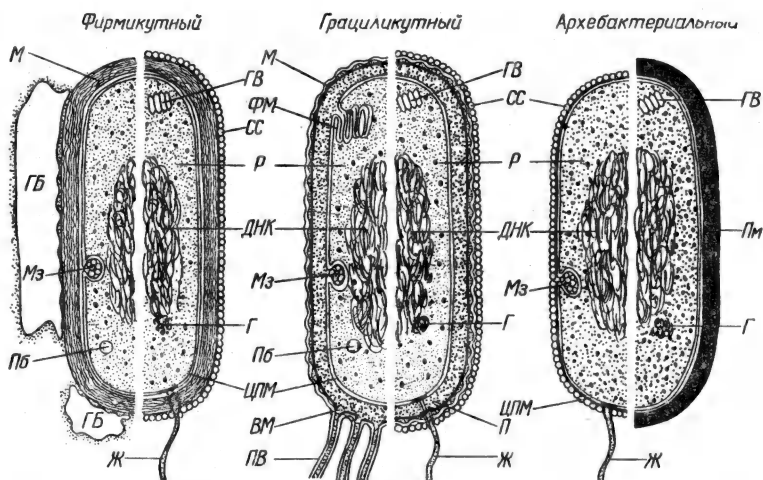


Рис. 3. Схематическое изображение различных типов прокариотных клеток. Внутренняя структура клеток архебактерий принципиально не отличается от таковой у обычных бактерий. Обращает на себя внимание только строение и состав клеточной стенки архебактерий — замена муреина на псевдомуреин, полисахариды или белки: М — муреин; Пм — псевдомуреин; ЦПМ — цитоплазматическая мембрана; ВМ — внешняя мембрана; СС — слой глобулярных белковых или гликопротеиновых субъединиц; Мз — мезосомы; Пб — запасное вещество (поли-β-гидроксibuтират); Г — гликоген; Р — рибосомы; ГВ — газовые вакуоли; П — периплазма; ФМ — фотосинтезирующий мембранный аппарат; Ж — жгутик; ГБ — газовый баллон; ПВ — периплазматические трубчатые выросты

дающие наружной мембраной и особой периплазматической зоной, называют фирмикутами.

Среди экстремально термофильных анаэробных зубактерий имеются виды, относящиеся как к фирмикутам, так и к грациликутам. Максимальная температура для оптимального роста у термофильных зубактерий достигает 80 °С. Архебактерии в этом отношении являются рекордистами: для ряда видов этой группы оптимальной температурой является 85—90 °С, а для *Pyrodictium occultum* — 105 °С. Можно без преувеличения сказать, что выделение этих бактерий составляет новую эпоху в микробиологии.

Виды термофильных зубактерий различаются между собой по спектру сбраживаемых углеводов, продуктам метаболизма, способности к хемолитотрофному питанию, особенностям первичной структуры ДНК и рибосомальных РНК, дополнительным слоям в клеточной стенке, состоящим из регулярно расположенных субъединиц.

Крайне интересными в морфологическом отношении являются бактерии рода *Dictyoglomus*. Они способны образовывать шары, в которые заключено от нескольких до десятков клеток. Оболочкой этих шаров является наружная мембрана, а между клетками находится обобщенная периплазма. Биологическое значение образования этих шаровидных образований остается загадочным.

Сходные шаровидные многоклеточные структуры свойственны и для анаэроба — *Fervidobacterium nodosum*. Однако, похоже, их оболочки образованы клеточной стенкой фирмикутного типа (хотя при окраске они относятся к грамтрицательным формам).

Особое положение среди термофильных анаэробных фирмикут занимают бактерии рода *Thermotoga*. На ультратонких срезах клеток у них не выявлен муреиновый слой, не выделяется он и препаративно, хотя биохимические исследования показывают, что типичные компоненты муреина у этих бактерий имеются.

Заметным событием в микробиологии было открытие Циллигом с соавторами в 1981—1983 гг. большой группы анаэробных архебактерий, которых они объединили в порядок *Thermoproteales*. Особенностью этих бактерий является их способность к «серному дыханию» и брожению неизвестного типа, в которых субстратами являются аминокислоты и углеводы. Кроме того, представителям этой группы свойственно большое разнообразие типов деления

клеток: почкованием, ветвлением, фрагментацией, «раскалыванием», перешнуровыванием. Некоторые виды порядка *Thermoproteales* являются облигатными хемолитоавтотрофами.

Получены также в чистых культурах уникальные метанообразующие экстремально термофильные бактерии, температурный оптимум развития которых находится в пределах 85 °С. Они выделены из горячих источников. Так, *Methanococcus jannaschii* получен Джонесом с соавторами в 1983 г. из осадков горячего источника, бьющего на глубине 2600 м на востоке Тихого океана.

Обращает также на себя внимание быстрый прогресс в изучении многообразия мезофильных метанообразующих бактерий. Если в 1974 г. было известно 4 рода и 7 видов, то в настоящее время в этой группе насчитывается уже 13 родов и 30 видов (за 8 последних лет описано 23 новых вида!).

Нельзя не упомянуть о кардинальных изменениях в группе сульфатвосстанавливающих бактерий, произошедших после 1980 г., благодаря работам Пфеннига и его сотрудников. Описано 5 новых родов этой группы бактерий, значительно различающихся морфологически. Открытие этих бактерий сняло вопрос, длительно существовавший в микробиологии, о том, какие организмы осуществляют разложение таких органических веществ, как ацетат, другие жирные кислоты и спирты, в анаэробных условиях (в присутствии в качестве акцепторов водорода — сульфатов).

Значительные достижения в последнее время получены при изучении многообразия спорообразующих анаэробных бактерий. В пределах настоящей статьи возможно охарактеризовать лишь некоторые из них, представляющиеся автору наиболее существенными.

В Институте микробиологии АН СССР выделена в чистой культуре и охарактеризована по комплексу необходимых признаков необычная анаэробная зубактерия, которая в одной клетке может образовывать по 4—5 спор. Последние представляют собой типичные эндоспоры, обладающие дипиколиновой кислотой, высокой термоустойчивостью, типичными специфическими для спор структурами. Таким образом, выяснен вопрос, не получавший своего решения в микробиологии свыше 100 лет. До последнего времени считалось, что бактерии могут образовывать в одной клетке лишь по одной споре.

Однако обнаружение многоспоровой анаэробной бактерии опровергает это мнение и вносит значительные изменения в представления о биологии прокариотной клетки и ее потенциальных возможностях. Для этой бактерии было предложено название — *Anaerobacter polyendosporus* (новые — и вид, и род) [3]. Установлена многоядерность клеток: они перед спорообразованием содержат по 3—6 нуклеотидов, часть из которых включается в споры. Одной из наиболее интересных особенностей является одновременное образование на каждом из полюсов клетки двух или трех спор. В связи с этим в трех- и пятиспоровых клетках споры дифференцируются на однополюсных и разнополюсных «близнецов». Между ними имеются структурно-морфологические различия, однако более близки между собой по морфологии, размерам и тонкому строению однополюсные «близнецы».

Предстоит еще выяснить другие вопросы по физиологии и биохимии этих спор. Другими особенностями новой бактерии являются: ее аэротолерантность, способность фиксировать атмосферный азот и отсутствие потребностей в витаминах для роста. Есть у этого анаэроба и кластридиальные свойства: способность сбраживать углеводы с образованием этанола, уксусной кислоты, небольших количеств масляной кислоты, ацетона и бутанола.

Со времени открытия эндоспор у бактерий Фердинандом Коном (1876—1877) и по настоящее время в микробиологии общепринятым является положение о том, что у бактерий (в связи с их «односпоровостью») процесс спорообразования не может считаться размножением. Выделение полиспоровой бактерии ставит под сомнение это положение и позволяет заключить, что хотя бы для некоторых бактерий эндогенное спорообразование может рассматриваться как процесс размножения в определенных условиях среды.

Необходимо вспомнить, что еще более 70 лет назад Шаттоном и Пера (1913) были описаны бактериоподобные организмы, образующие по 4—8 спор в одной клетке. Они являются обитателями кишечника морской свинки. Для них было предложено название — *Metabacterium polyspora*. Описание морфологии этого микроорганизма дал в 1928 г. известный советский микробиолог Н. А. Красильников в одной из своих первых научных работ. Однако, к сожалению, никому еще не удалось получить ни чистую,

ни накопительную культуру этого загадочного организма. Его природа, ультраструктурная организация спор остаются невыясненными, хотя имеющиеся микроскопические наблюдения позволяют допустить его прокариотную природу. Но *Anaerobacter polyendosporus* по ряду свойств резко отличается от *Metabacterium polyspora*. Выделение этого организма и изучение его в чистой культуре позволили получить новые ценные данные для решения проблемы эволюции спорообразования и биологии прокариотной клетки.

Одними из наиболее загадочных микроорганизмов до последнего времени оставались крупные многоклеточные трихомные анаэробы — обитатели кишечника некоторых животных — *Oscillospira* и *Arthromitus*. Род *Arthromitus* был описан как спорообразующий еще в середине прошлого века, а *Oscillospira* — в начале XX столетия. Однако принадлежность этих микробов к прокариотам и природа их спор оставались до последнего времени неясными. В электронно-микроскопических исследованиях, выполненных Грейном, Сено, Чейзом, Эрландсеном и другими, было показано, что *Oscillospira* и *Arthromitus* являются прокариотными организмами. Их клетки имеют ультраструктурную организацию, характерную для фирмикут. Их споры как по механизму спорообразования, так и по структуре сходны с бактериальными эндоспорами.

К сожалению, эти бактерии не удается получить в чистых культурах, возможно, в связи с их высокой чувствительностью к кислороду либо в связи с их существованием в синтрофных ассоциациях.

Изучение анаэробных бактерий уже внесло определенный вклад в спорологию: при использовании анаэробов в качестве модельных организмов были обнаружены новые своеобразные клеточные структуры — крупные трубчатые и лентовидные (и другие формы) выросты, а также газовые колпачки на спорах, состоящие из скоплений газовых везикул (рис. 4). Подобные структуры не найдены у спор аэробных бактерий; причина их отсутствия в этой группе прокариот не ясна.

С другой стороны, при изучении спор такого анаэроба, как *Clostridium butyricum* (и близких этому виду клостридиев), было обнаружено, что споры содержат специфические вещества с радиопротекторными свойствами. По-видимому, повышенная радиоустойчивость эндоспор объясняется не только их особой структурой и анабио-

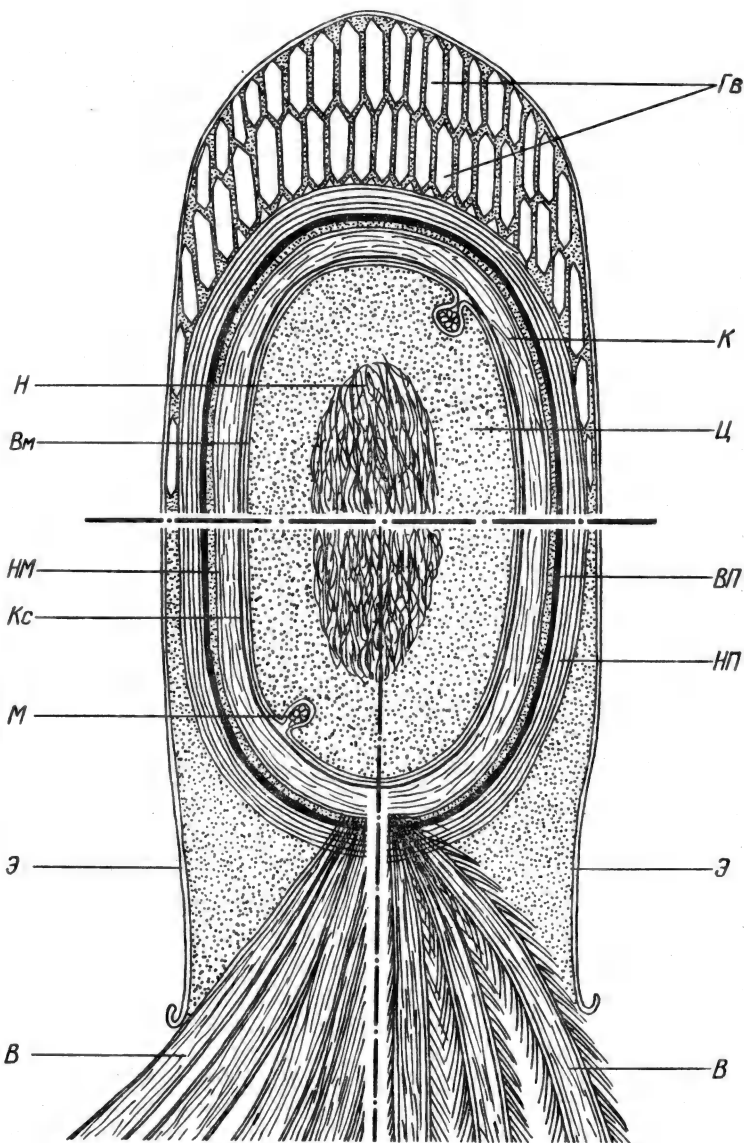


Рис. 4. Основные структуры спор анаэробных бактерий. Обозначения на схеме: *Н* — нуклеотид; *ВМ* — внутренняя мембрана споры; *НМ* — наружная мембрана споры; *Кс* — зародышевый слой клеточной стенки; *М* — мезосома; *Э* — экзоспориум; *В* — трубчатые и лентовидные выросты на споре; *Гв* — газовые везикулы; *К* — кортекс (кора); *Ц* — цитоплазма; *ВП* — внутренние слои белковых покровов; *НП* — наружные слои покровов.

тическим состоянием, но и присутствием в них радиопротекторных соединений. Интересно, что эти вещества проявляют радиопротекторный эффект и при введении их в организм животных.

Принципиально новые данные принесло изучение строения и цикла развития спорообразующей нитчатой бактерии, обитающей в подвздошной кишке мышей. Эти бактерии, образующие многоклеточные нити, прикрепленные к эпителиальным клеткам слизистой кишечника с помощью специальных конечных сегментов, названы прикрепительными сегментами или клетками. По морфологическим признакам они отнесены к семейству *Arthromitaceae*.

Обнаружено, что у этих бактерий, так же как и при спорообразовании, формирование прикрепительных (якорных) клеток происходит в результате асимметричного деления и процесса «поглощения» одной клетки другой. Однако последующие этапы иные: фиксаторные клетки способны делиться внутри материнских клеток и выходить из них после созревания. Назначение прикрепительной клетки — войти в контакт со слизистой кишечника, прикрепиться к ней и дать начало росту новому трихому. Для этого клетки снабжены «прикрепительной пятой» — специализированным, заостренной формы полюсом клетки. Полюс прикрепительной клетки при контакте со слизистой подвздошной кишки мыши или крысы погружается в лунку, образованную путем впячивания мембраны эпителиальной клетки кишечника.

Таким образом, впервые показано, что у бактерий специфический тип внутриклеточной дифференцировки, сходный по механизму со спорообразованием, может использоваться для образования особых клеток, отличающихся: а) отсутствием покоя (во всяком случае той степени, который присущ известным специализированным репродуктивным структурам прокариот — эндоспорам, цистам, экзоспорам, конидиям) и б) способностью к делению внутри материнских клеток.

В других условиях у этого же вида анаэробных бактерий могут формироваться типичные эндоспоры, обладающие спороспецифическими структурами — кортексом, покровами и дегидратированной, не способной воспринимать электронные красители сердцевиной.

Заметным событием в анаэробной бактериологии явилось описание в последние годы четырех групп новых видов анаэробов, уникальных по ряду свойств: 1) «хищ-

ных» прокариот; 2) галофильных форм; 3) фототрофной «грамположительной» бактерии; 4) «грамотрицательной» спорообразующей бактерии.

«Хищные» анаэробные бактерии, паразитирующие на других анаэробных бактериях (фототрофных пурпурных серобактериях), были обнаружены Гуэрро с соавторами. Одна из бактерий является эктопаразитом, т. е. бактерией-пиявкой: ее клетки прикрепляются к клеткам жертвы и вызывают их гибель. Другая бактерия определена как эндопаразит: она проникает в цитоплазму клетки бактерии-жертвы. Эти данные представляют большой интерес как в связи с пониманием регуляции численности фототрофных бактерий в природных средах, так и в связи с выяснением вопроса об эволюции специализированных бактерий — паразитирующих на других бактериях. До сих пор были известны лишь аэробные бактерии с подобными свойствами.

Ореном и Зейкусом с соавторами выделены и охарактеризованы галофильные анаэробы: они охарактеризованы как грамотрицательные зубактерии, филогенетически (по нуклеотидному составу 16S рРНК) далеко отстоящими от других эволюционных групп прокариот.

Большое значение имеет выделение Гестом и Фавингером (1983) новой анаэробной фототрофной зеленой бактерии, названной *Heliobacterium chlorum*. Это первая фототрофная, содержащая хлорофилл, бактерия с фирмикутным строением клеточной стенки. Она содержит особый бактериохлорофилл *g*. Определение частичной нуклеотидной последовательности 16S рРНК свидетельствует, что *H. chlorum* близка к грамположительным бактериям (фирмикутным), в особенности к спорообразующей аэробной бактерии — *Bacillus subtilis*.

Новая фототрофная бактерия еще слабо изучена, многие ее физиологические и биохимические свойства еще не определены. Однако уже сейчас ясно, что ее изучение будет иметь важное значение для понимания путей эволюции грациликутных и фирмикутных бактерий, а также эволюции бактериального фотосинтеза.

Не менее интересным достижением является обнаружение грамотрицательных анаэробных спорообразующих бактерий рода *Sporomusa* (описана Мёллером с соавторами в 1984 г.). Эта бактерия описана как химера, обладающая как свойствами истинно грамположительных (фирмикутных) бактерий (поскольку образует эндоспоры),

так и грамотрицательных (грациликотных) бактерий, поскольку в состав ее клеточных стенок, как утверждается, входит наружная мембрана и липополисахарид. По олигонуклеотидному составу 16S рРНК представители рода *Sporomusa* также обнаружили определенное родство с фирмикотными прокариотами. Как известно, все хорошо изученные спорообразующие бактерии относятся к истинным грамположительным бактериям (фирмикотным). Поэтому изучение новой спороносной бактерии со столь необычным сочетанием свойств имеет большое значение, оно поможет понять эволюцию бактериального спорообразования и происхождения фирмикотных бактерий. Можно предположить, что свойства бактерий рода *Sporomusa* являются результатом переноса генов между далекими группами прокариот. Несомненно, дальнейшее изучение этих бактерий принесет новые интересные результаты.

Таким образом, изложенные выше материалы свидетельствуют о быстром прогрессе того раздела микробиологии, который связан с изучением облигатно анаэробных микроорганизмов. За десять последних лет в области выделения новых форм анаэробов получены результаты, большие, чем за всю предыдущую историю развития микробиологии. Очевидным является вывод о том, что в ближайшие годы в этом направлении будут получены новые важные достижения.

Анаэробы в биотехнологии. Быстрое развитие микробиологической промышленности во всем мире, возникновение новой отрасли биотехнологии, связанной с генетической инженерией, несомненно, свидетельствует о том, что в ближайшем будущем возникнет необходимость использования в народном хозяйстве и медицине всего доступного микробного генофонда. В этом случае новые микроорганизмы могут рассматриваться не только как потенциальные производственные штаммы — инициаторы тех или иных процессов, продуценты полезных соединений, но и как носители практически ценных генов, которые могут быть перенесены в клетки других микроорганизмов. Таким образом, микробная коллекция культур — это своеобразный банк генов, банк природного генофонда. Поэтому ясно, что от степени познания многообразия микробного мира, выделения новых форм микроорганизмов зависит и прогресс биотехнологии.

Известно, что облигатные анаэробы давно нашли использование в микробиологической промышленности.

Можно считать, что первым крупнотоннажным промышленным производством, основанным на использовании облигатных анаэробов, было получение растворителей. В этом процессе использовались возбудители ацетонобутилового брожения — клостридии. Эти организмы нашли также применение и на льнозаводах как возбудители процессов мацерации стеблей лубоволокнистых растений.

Открытие новых больших групп экстремально-термофильных бактерий сразу же выдвинуло вопрос о возможном их практическом использовании в промышленности. Основное внимание в этом плане было уделено этанологенным термофилам — целлюлозолитическим и сбраживающим растворимые углеводы (прежде всего в связи с проблемой использования возобновляющихся источников растительного сырья и получением жидкого биотоплива). Однако не меньшее значение может иметь использование термофильных анаэробов как продуцентов термостабильных белков и ферментов, ценных химикалий и физиологически активных соединений.

Основные преимущества термофильных анаэробных процессов по сравнению с мезофильными очевидны. Они состоят прежде всего в: 1) сокращении сроков ферментации; 2) возможности обойтись без аэрации сред; 3) уменьшении вероятности заражения сред вредными для ферментационных процессов, а возможно, и опасными для человека микроорганизмами.

Однако выявились и главные недостатки этих процессов: 1) сравнительно низкий уровень выхода этанола; 2) низкая толерантность термофилов по сравнению с дрожжами к этанолу (до 5 % этанола в среде по сравнению с 8—10 % — для дрожжей); 3) необходимость дополнительной затраты энергии для осуществления ферментаций при высоких температурах.

Усилия экспериментаторов были направлены на устранение первых двух недостатков. С этой целью проводились получение, отбор и изучение мутантов по признакам: а) повышение толерантности к этанолу; б) уменьшение выхода органических кислот (и увеличение в связи с этим продукции этилового спирта). С другой стороны, изучалась эффективность микробиологических и технологических изобретений и приемов. Так, с целью увеличения выхода этанола и расширения спектра используемых углеводов в смешанных субстратах предложено применять

комбинированные культуры («микробные системы»), представляющие собой ассоциации культур разных видов. Например, бинарная ассоциация, состоящая из целлюлозолитической культуры *Clostridium thermocellum* и сахаролитической — *Thermoanaerobacter ethanolicus* предложена Льюнгдалом и Вигелем и запатентована в США в 1981 г. (пат. № 4292406). Зейкус с соавторами получили патент на использование для получения этанола путем ферментации биомассы смешанных культур: *C. thermocellum*, *C. thermohydrosulfuricum* и *Thermoanaerobium brockii* (патент США № 4400470, 1983 г.). Применение сахаролитических (гликолитических) анаэробов в этих ассоциациях позволяет достичь более высокого выхода спирта за счет того, что сахаролитики удаляют из среды углеводы, тормозящие активность целлюлозолитического организма, и, кроме того, часть этих углеводов они также превращают в этанол. На смешанных субстратах, растительном сырье сахаролитические бактерии способны сбраживать такие органические вещества (недоступные для целлюлозолитических клостридиев), как пектины, гемицеллюлозы, крахмал.

Предлагаются также технологические решения, чтобы снизить ингибирующее воздействие этанола на развитие целлюлозолитических бактерий, а именно: удаление спирта с помощью слабого вакуума или продуванием CO_2 через среды. Однако эти операции удорожают стоимость этанола. Один из микробиологических способов решения проблемы состоит в выделении новых природных форм целлюлозолитических микроорганизмов с оптимальной температурой роста, близкой температуре кипения этанола ($78,5^\circ\text{C}$), что позволило бы параллельно процессу брожения осуществлять отгонку спирта. Получен новый вид клостридий — *Clostridium stercorarium*, однако его оптимальная температура для развития (65°C) лишь на 5° выше, чем у представителей единственного термофильного вида спороносных целлюлозолитических анаэробов — *Clostridium thermocellum* (Мадден, 1983).

В последнее время выделен новый род экстремально-термофильных неспороносных целлюлозолитических анаэробных бактерий — *Caldocellum saccharolyticum* (1986 г.). Оптимальная температура развития этого организма $\sim 68^\circ\text{C}$. Но этанол не образуется им в процессе брожения. Таким образом, экстремально термофильные анаэробы, образующие этанол в процессах брожения органических

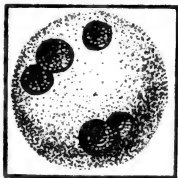
веществ при температуре $\sim 80^{\circ}\text{C}$, до сих пор не выделены. Описанный недавно сахаролитический анаэроб *Thermotoga maritima* (1986 г.), хорошо развивающийся при этой температуре, может рассматриваться как возможный продуцент лактата.

Большое внимание привлекают к себе термофильные анаэробы в связи с тем, что они являются перспективными продуцентами ряда практически ценных термостабильных ферментов. Так, *Clostridium thermohydrosulfuricum* образует чрезвычайно стабильную амилазу, *C. thermosulfurogenes* — полигалактуронидазу и пектинметилэстеразу, а у *C. thermosaccharolyticum* обнаружена первая нитрогеназа термофильных эубактерий.

Несомненно, что в ближайшие годы будут получены новые важные данные по биологии анаэробных бактерий и их практическому использованию в народном хозяйстве.

Литература

1. Дуда В. И., Лебединский А. В., Кривенко В. В. Археобактерии в системе царств органического мира // В сб.: Успехи микробиологии.— 1985, 20.— С. 3—38.
2. Woese E. R., Fox G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 1977, 74, 5088—5099.
3. Дуда В. И., Мушегян М. С., Лебединский А. В., Митюшина Л. Л. Образование четырех-пяти эндоспор в одной клетке у новой анаэробной бактерии // Доклады Академии наук СССР.— 1985.— Т. 285.— № 1.— С. 241—245.



Н. Н. СУХАРЕВА-НЕМАКОВА,
доктор биологических наук

Простейшие как объекты биотехнологии

Простейшие относятся к числу нетрадиционных объектов биотехнологии. В настоящее время они лишь завоевывают себе место в исследовательской работе и микробиологической промышленности как продуценты биологически активных веществ.

Что же представляют собой эти организмы? Простейшие составляют подцарство микроскопических животных — Protozoa. Большинство из них — одноклеточные; ряд видов имеет многоклеточные стадии в цикле своего развития; некоторые простейшие ведут колониальный образ жизни.

Простейшие представляют собой особый уровень организации живой материи, сочетающий в себе клетку в морфологическом отношении и организм — в функциональном отношении (Полянский, 1971). В настоящее время известно 65 тыс. видов простейших, среди которых 55 тыс. видов — свободноживущие организмы и 10 тыс. видов ведут паразитический образ жизни. Ранее все простейшие были отнесены к единому типу Protozoa на основании морфологических данных, полученных с помощью светоптического микроскопа (Догель, 1947). Считалось, что все простейшие построены по единому плану, сходному с клетками многоклеточных животных (Metazoa).

Развитие электронно-микроскопических методов исследования позволило выявить особенности ультраструктуры простейших на всех стадиях жизненных циклов. На основании электронно-микроскопических данных о строении тела, изучения способов питания и движения, особенностей жизненных циклов и т. д. Международный комитет по систематике и эволюции простейших внес в 1980 г. коррективы в классификацию простейших. Тип Protozoa был переведен в ранг подцарства и разделен на 7 типов.

Параллельно в Ленинграде сотрудниками Зоологического института АН СССР были разработаны «Принципы построения макросистемы одноклеточных животных». Принимая систематику простейших, созданную международным коллективом протозоологов, авторы вносят в нее

ряд уточнений и поправок. В результате подцарство Protozoa было разделено ими на 9 типов: Mastigophora, Opalinidomorpha, Sarcodina, Acanthariae, Sporozoa, Microsporidia, Cnidosporidia, Ascetosporea, Ciliophora (Крылов с соавторами, 1980).

Наиболее интересными в эволюционном отношении являются представители типа Mastigophora (жгутиконосцы), с которыми связывают становление гетеротрофности и многоклеточности у эукариот.

Жгутиконосцы — обширный таксон, включающий организмы с разнообразной морфологией и типами питания — от фототрофии до паразитизма. Для их классификации используется ряд критериев: тип питания, строение органов движения, ультратонкое строение цитоскелета, митохондрий, хлоропластов, состав хлорофиллов, наличие фикобилинов, β -каротина, ксантофиллов и некоторых других дополнительных признаков (Серавин, 1980). По определению Л. Н. Серавина, жгутиконосцы — это одноклеточные или колониальные организмы, которые на стадии трофонта имеют жгутик (жгутики) и цитоскелет, образованный кинетосомальными корневыми нитями.

В состав типа Mastigophora входят два подтипа: Tubulacristata (имеющие митохондрии с трубчатыми кристами) и Lamellacristata (имеющие митохондрии с пластинчатыми кристами). Первый подтип содержит три надкласса окрашенных жгутиконосцев: Chromomastigonta (имеющие хлорофиллы, a , c^1 , c^2), Parachromomastigonta (только хлорофилл a), Dinomastigonta (хлорофиллы a , c^2) и два надкласса бесцветных жгутиконосцев (зоофлагеллят): Parachrysozoomastigonta и Parasitomastigonta.

К подтипу Lamellacristata относятся два надкласса окрашенных жгутиконосцев: Cryptomastigonta (набор хлорофиллов a , c^2), Chloromastigonta (хлорофиллы a , b) и два надкласса бесцветных жгутиконосцев: Kinetoplastomastigonta и Choanomastigonta. Все окрашенные жгутиконосцы сочетают в себе черты растений и животных. Они способны к фотосинтезу как растения, в то же время активно перемещаются в окружающей среде, что принципиально отличает их от растений. Более того, во всех классах окрашенных флагеллят в процессе их эволюции появляются бесцветные формы: в 8 классах из 10 известны виды, потерявшие способность к фотосинтезу и перешедшие к хемотрофному или гетеротрофному способу питания. Для представителей 8 классов показано наличие

анимального способа питания — фаготрофии (фагоцитоза). Способность к фагоцитозу обнаружена не только у бесцветных, но и у окрашенных жгутиконосцев. Следовательно, *Mastigophora* совмещают в себе черты животных и растений с преобладанием у разных видов тех или других особенностей.

На этом основании продолжается жаркий спор между протозоологами и ботаниками за эти объекты. Но здесь дело не в точках зрения ученых, а в особом уровне организации этих существ, которые не случайно были определены великим систематиком Карлом Линнеем как «животнорастения» (*Zoophyta*).

Серьезные экспериментальные подтверждения получила гипотеза о том, что жгутиковые простейшие являются непосредственными предками современных многоклеточных животных и растений, образуя между ними мост (Серавин, 1984).

Знание положения изучаемого объекта в системе живого мира и его экологии имеет для биотехнолога не чисто академический интерес, а позволяет создать условия культивирования с учетом особенностей биологии простейшего данного вида.

Филогенетическая близость простейших к многоклеточным животным и растениям является теоретическим обоснованием для изучения этих организмов как возможных продуцентов биологически активных веществ, свойственных природе человека и животных. Такие вещества могут оказывать лечебное действие при различных патологических состояниях, связанных с нарушением их биосинтеза в организме млекопитающего.

В качестве продуцентов биологически активных веществ рациональнее использовать свободноживущих простейших, обладающих разнообразными биосинтетическими возможностями и потому широко распространенными в природе. Они являются важной составной частью геологических пород, почв, пресных и морских вод, участвуют в образовании трофических связей и круговороте веществ в природе. Особую экологическую нишу занимают простейшие, обитающие в рубце жвачных животных. Они обладают ферментом целлюлазой, способствующей разложению клетчатки в желудке жвачных. Простейшие рубца могут быть источником этого ценного фермента.

Важное значение для медицины имеют паразитические виды простейших, распространенные в странах жаркого

климата. Как правило, эти паразиты имеют сложные циклы развития в переносчике (насекомое) и основном хозяине (млекопитающее). Они обитают в крови и тканях человека и животных, поражают некоторые виды растений, затрудняя экономическое развитие обширных районов тропической Африки и Южной Америки. Например, африканские трипаномы (*Trypanosoma gambiense* и *Trypanosoma rhodesiense*), попадая в кровь человека, вызывают опаснейшее заболевание — сонную болезнь (африканский трипаномоз). Переносчиком этого заболевания является муха цеце (*Glossina palpalis*). Ежегодно регистрируется 20 тыс. случаев этого заболевания, и 50 млн. человек ежегодно подвержены риску заражения этими трипаносомами. Другие виды африканских трипаном (*T. congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. evansi* и др.) поражают домашний скот. В Южной Америке люди болеют другой разновидностью трипаномоза, вызываемого *T. cruzi*. Этим заболеванием, называемым болезнью Чагаса, страдают более 10 млн. человек. В южных республиках Советского Союза *T. evansi* вызывает заболевание у верблюдов (су-ауру), а *T. equiperdum* — случную болезнь лошадей. Широко распространены во многих странах Средиземноморья, Юго-Восточной Азии и южных республиках СССР лейшманиозы — заболевания, вызываемые лейшманиями — организмами, близкими по строению к трипаносомам.

К числу опасных инвазивных заболеваний человека относится малярия, вызываемая простейшими рода *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*). В настоящее время от малярии страдают 400 млн. человек, живущих в странах тропического климата. Малярия является причиной высокой детской смертности в этих странах. Широкие международные связи с развивающимися странами расширили ареал распространения этого заболевания. Проблема завоза малярии в СССР из развивающихся стран стала весьма острой (Сопрунов, 1981).

Таким образом, здравоохранение и ветеринария ставят перед исследователями задачу изучения молекулярных, биохимических, физиологических и цитологических особенностей паразитических простейших с целью создания вакцин, диагностикумов и лекарственных препаратов для борьбы с этими возбудителями столь опасных заболеваний.

Решение поставленных задач требует масштабирован-

ного получения культур свободноживущих и паразитических простейших для выделения биологически активных веществ, что возможно только на основе методов биотехнологии. В связи с этим перед исследователями стоит проблема разработки единой биотехнологической системы получения метаболитов протозойного происхождения. Эта система основана на глубоком изучении физиологии и биохимии простейших и предусматривает разработку ряда стадий:

- выделение, аксенизацию и клонирование культур простейших;
- создание сред для культивирования этих организмов;
- разработку биотехнологических аспектов культивирования простейших;
- изучение закономерностей развития культур простейших;
- выделение биологически активных веществ из культур простейших и изучение путей интенсификации их биосинтеза.

Целью данного обзора является отражение достижений протозоологов в области биотехнологии.

Выделение, аксенизация и клонирование культур простейших

Одним из наиболее распространенных приемов является выделение простейших в культуру с помощью микроманипулятора. Б. Ф. Жуков и А. П. Мыльников в Институте биологии внутренних вод АН СССР разработали подобную методику выделения и длительного поддержания 41 культуры бесцветных жгутиконосцев как существенного компонента водных биоценозов и очистных сооружений.

Другой метод заключается в применении антибиотиков, нетоксичных для данного простейшего, но губительно действующих на сопутствующие виды бактерий и грибов. Наиболее часто употребляются антибактериальные антибиотики — пенициллин, стрептомицин, канамицин и левомицетин — в смеси с антифунгальными антибиотиками — нистатином, амфотерицином, леворином, гризеофульвином. Успех применения этого метода обусловлен двумя факторами: наличием концентрированных суспензий простейших и подбором таких антибиотиков и в таких концен-

трациях, которые бы избирательно подавляли сопутствующие микроорганизмы. Концентрации антибиотиков для разных культур варьируют от 1 до 100 мкг/мл.

Выделение в культуру и аксенизация паразитических простейших — значительно более трудная задача по сравнению со свободноживущими видами. Это связано с тем, что паразиты нуждаются в более сложных средах, медленнее растут, требуют постоянной смены среды, подобно тому как это делается при культивировании тканей.

Долгое время оставались безуспешными попытки выделения в культуру и аксенизации паразитического жгутиконосца рода *Lamblia* (*Giardia*). Впервые в мире моноксеническую культуру этого паразита удалось получить А. Е. Карапетяну в 1960 г. Благодаря разработанной им методике был получен ряд новых данных по биологии лямблий, что явилось важным этапом в разработке методов диагностики и химиотерапии лямблиозов. Оригинальный метод аксенизации культур лямблий разработали сотрудники Института экспериментальной биологии АН ЭССР Г. М. Лахонина и Ю. Х. Терас. Метод основан на способности трофозоитов этих простейших при культивировании в полужидкой среде (1,5 % агара) мигрировать в верхние слои, отделяясь от неподвижных дрожжевых клеток. Этот метод позволил упростить технику очищения лямблий от дрожжей, сократить сроки получения чистых культур, уменьшить расход дефицитной питательной среды, сохранить лямблии без пересева в течение длительного времени (Лахонина, Терас, 1978).

Культуры простейших очень неоднородны по отношению к физическим и химическим факторам, в частности, к температуре, тяжелым металлам, лекарственным препаратам. В связи с этим протозоологи стали применять метод клонирования культур простейших.

Клон — это популяция особей, являющихся потомками одной материнской особи. Техника клонирования культур простейших довольно разнообразна и, как правило, более сложная, чем для бактериальных культур, поскольку простейшие медленно образуют едва заметные колонии. Клонирование производят на поверхности твердого агара, залитого в чашки Петри или в стеклянные флаконы с плоскими стенками (матрацы). Через определенные промежутки времени к поверхности агара добавляют небольшое количество жидкой питательной среды или буфера для предотвращения высыхания колоний.

Выделение отдельных клонов трипаносом дало возможность обнаружить, что особи каждого клона имеют свой поверхностный антиген белковой природы, отличный по составу аминокислот и их последовательности от антигенов других клонов. Биохимические различия между этими белками настолько значительны, что можно предполагать, что каждый из них — продукт экспрессии отдельного гена. Такие антигены названы переменными поверхностными гликопротеинами (ВПГ), а само явление — антигенной переменностью. Чем это явление опасно для человека и животных? Благодаря антигенной переменности определенная часть популяции трипаносом избегает взаимодействия с антителами, которые вырабатывает иммунная система. Эти выжившие клетки дают начало новой популяции трипаносом, несущих ВПГ иного состава. Пока иммунная система вырабатывает новые антитела, часть трипаносом успевает переключиться на биосинтез ВПГ третьего типа. Таким образом, иммунная система не способна «угнаться» за изменчивостью паразита и в этих условиях становится фактором отбора наиболее устойчивых клонов.

Для биохимического изучения обширного набора антигенов простейших необходимо массовое культивирование отдельных клонов, которое возможно только на основе методов микробиологической биотехнологии.

Среды для культивирования простейших

Включение простейших в традиционную микробиологическую культуру, выращиваемую в строго контролируемых условиях, — единственно правильный путь к более глубокому познанию обменных процессов у простейших и практическому использованию продуктов их жизнедеятельности.

Важнейшим условием успешного культивирования является разработка сред, соответствующих физиологическим потребностям этих организмов.

Среды, предложенные исследователями для культивирования различных групп простейших, можно классифицировать по химическому составу на среды комплексные и синтетические. По физическому состоянию различаются среды плотные, полужидкие, жидкие и жидкие с твердой фазой (двухфазные).

Комплексные среды применяются главным образом

для культивирования паразитических простейших. Состав этих сред усложняется в зависимости от степени паразитизма простейшего. Наиболее типичными компонентами комплексных сред являются пептоны различных марок, триптоны (гидролизаты белка, полученные с помощью поджелудочной железы), цельная или дефибрированная кровь, сыворотка крови, лактоальбумин, дрожжевой автолизат, отвар печени, мясной бульон, различные углеводы, фосфатный буфер, микроэлементы.

Нередко выращивание простейших осуществляется на средах, применяемых для культивирования тканей животных (например, среда № 199, среда PRM 1640 для культивирования клеток селезенки мышей). Обогащение сред для культивирования трипаносом иммунокомпетентными клетками — макрофагами и тимоцитами, дало возможность увеличить число простейших в 200 раз и сохранить их инфекционность. Нередко для получения соответствующих стадий жизненного цикла в среды добавляются органы переносчиков (например, слюнные железы или кишечник мухи це-це).

Для культивирования некоторых видов паразитических простейших созданы синтетические среды. Такие среды очень сложны по составу. Они содержат полный набор аминокислот, нуклеотидов, витаминов группы В, ряд органических кислот, креатин, креатинин, АТФ, липиды, микроэлементы и другие компоненты. Недостатками этих сред являются присутствие весьма дефицитных дорогостоящих компонентов, а также слабый рост паразитов. Но именно эти среды дали возможность выявить биосинтетические возможности различных видов паразитических простейших.

Анализ их состава позволяет заключить, что среды для культивирования трипаносомид — паразитических простейших должны содержать в качестве обязательных компонентов следующие группы веществ: 1) углеводы (чаще глюкозу, фруктозу или маннозу) как источник энергии и углерода; 2) аминокислоты в качестве источника азота, а при отсутствии углеводов в среде углеродные скелеты аминокислот используются как источник углерода; аминокислоты стимулируют дыхание трипаносомид; 3) гематин как источник геминовых групп, входящих в состав порфиринсодержащих ферментов; 4) пуриновые и пиримидиновые основания в качестве предшественников для построения нуклеиновых кислот; 5) витамины груп-

пы В, входящие в состав коферментов клеток; 6) фосфаты натрия и калия, использующиеся как источники неорганического фосфора для конструктивных процессов, а также для создания буферной емкости среды; 7) смесь хлористых солей натрия и калия в качестве «осмотического фактора»; 8) микроэлементы.

Особенности экологии свободноживущих простейших определили и эволюционно закрепили их широкие биосинтетические возможности. В связи с ограниченными потребностями этих организмов в экзогенных источниках питания и энергии среды для культивирования этих организмов достаточно просты. Как правило, в средах для культивирования свободноживущих простейших используются неорганические источники азота, сахара, органические кислоты или спирты в качестве источников углерода и энергии; фосфаты — как источник фосфора и для создания буферной емкости среды; смесь хлористого натрия и хлористого калия — для создания определенного осмотического давления, смесь микроэлементов, некоторые витамины группы В (обычно V_1 и V_{12}).

Характерной особенностью пресноводных простейших рода *Astasia* (подпорядок *Euglenina*) является отсутствие способности использовать углеводы. Это связано как с низким уровнем гексокиназной активности, так и с барьерной функцией клеточных мембран этих организмов для углеводов. Лучшим источником углерода и энергии для представителей рода *Astasia* является этанол. Замена ацетата в среде Крамера — Майера этанолом привела к увеличению плотности популяции простейших в 10—15 раз. К. М. Сухановой и Т. Г. Ривель изучена устойчивость *A. longa* и *E. gracilis* к повышенным концентрациям этанола и установлены клоновые различия в культурах обоих видов эвгленид по этому признаку. Поскольку этанол является одним из дешевых источников углерода и энергии, использование эвгленид как продуцентов биологически активных веществ является перспективным.

Культивирование многих свободноживущих и паразитических простейших основано на их способности фагоцитировать клетки бактерий и дрожжей. Не все виды бактерий одинаково благоприятны для получения тех или иных культур простейших.

По данным В. Е. Коковой, для культивирования инфузорий *Paramecium caudatum* наиболее благоприятными являются *Bacillus subtilis* или *Aerobacter aerogenes*, а так-

же смесь *B. subtilis* и дрожжей *Saccharomyces ellipsoides*. Для культивирования жгутиконосца *Lamblia* необходимы дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

Знание особенностей физиологии питания простейших является необходимым условием для научного обоснования и разработки сред для их культивирования.

Биотехнологические аспекты культивирования простейших

Существуют два принципиально различных метода массового культивирования простейших. Наиболее распространенным и традиционным является метод периодического культивирования, при котором развитие культуры происходит без смены среды. Второй метод — непрерывное культивирование, был разработан в 50-х годах для выращивания микроорганизмов.

Непрерывное культивирование простейших было впервые осуществлено в 1964 г. Г. Падиллой и Т. Джеймсом в специально разработанном ими аппарате. В нашей стране работы по непрерывному культивированию простейших и беспозвоночных успешно развиваются в Институте биофизики Сибирского отделения АН СССР (г. Красноярск) под руководством В. Е. Коковой.

Для различных видов простейших в зависимости от типа питания (гетеротрофия, фаготрофия или фототрофия) разработаны ферментеры нескольких конструкций. Одноступенчатый хеостат с вертикальными люминесцентными лампами был предложен для культивирования *Euglena gracilis*, двухступенчатый хеостат — для культивирования *Tetrahynema pyriformis*, культиватор с эрлифтом — для *Paramecium caudatum*. Следует отметить, что кинетика роста культур простейших возрастала с увеличением скорости разбавления.

Непрерывное культивирование применяется не только для получения массовых культур простейших, но и для их синхронизации. Для этого используют две батареи сообщающихся ферментеров по 10 штук в каждой. В батареях поддерживаются разные температуры (оптимальная — 25—28° и повышенная — 30—33°).

Непрерывное культивирование открывает большие возможности для моделирования природных процессов взаимодействия популяций различных организмов. Существует несколько методов непрерывного культивирования,

из которых наиболее перспективным оказался метод непропорционально-проточного культивирования (Кокова, Лисовский, 1976). Характерной особенностью этого метода является то, что клетки и отводимая культуральная жидкость находятся в ином соотношении, чем в культиваторе. По мнению В. Е. Коковой, в условиях непропорционального протока, когда коэффициент непропорциональности может быть высок за счет оседания парамеций на стенках ферментера и других устройствах, отделяющих клетки от культуральной жидкости, достигается высокая плотность особей. Метод непропорционально-проточного культивирования используется не только для культивирования простейших, имеющих небольшие размеры, но также и для макроинфузорий (*Stentor*, *Spirostomum*), достигающих более 200 мкм.

Решающим фактором для развития аэробных простейших является режим аэрации культур (состав газовой смеси и скорость ее продувания). Для развития трипаносом оптимальным является добавление к воздуху 10—20 % кислорода в процессе культивирования; для выращивания *Euglena gracilis* на свету используется воздух с добавлением 5 % углекислоты. Режим продувания (барботирования) варьирует от 0,5 до 2,0 объемов воздушной смеси на 1 л среды в минуту в зависимости от вида простейшего.

Среди простейших имеется много анаэробных организмов. В этом случае используется обычная микробиологическая техника для создания анаэробных условий в среде.

Простейшие очень чувствительны к температуре культивирования, которая должна соответствовать температуре среды их естественного обитания.

Основные закономерности развития культур простейших

Подобно микроорганизмам, характер развития простейших, перенесенных в искусственную среду, определяется как составом среды, так и целым рядом других факторов: количеством и качеством посевного материала, температурой, условиями аэрации, значениями pH, окислительно-восстановительного потенциала и др.

Правильное представление о многообразии процессов, сопровождающих развитие простейших в культуре, можно

получить на основе изучения их в кинетике и тесной взаимосвязи.

Простейшие в искусственных средах проходят определенный цикл развития, характеризующийся различной скоростью размножения и отмирания, закономерными физиологическими и морфологическими изменениями. Продолжительность отдельных фаз роста определяется на основе изучения следующих параметров: удельной скорости размножения, времени генерации и константы скорости деления особей.

Продолжительность лаг-фазы у разных видов простейших варьирует в среднем от 8 до 48 часов, после чего культуры переходят в экспоненциальную фазу роста. Длительность экспоненциальной фазы в среднем составляет 70—198 часов, но у паразитических видов может быть больше.

Продолжительность стационарной фазы также сильно варьирует. Например, у кинетопластид она составляет 72—144 часа, а у эвглены *Astasia longa* — 24 часа.

Скорость отмирания определяется чувствительностью изучаемого вида простейшего к дефициту важнейших компонентов среды и продуктам обмена.

Характерной особенностью представителей порядка Kinetoplastida является способность к саморегуляции рН среды. На первых фазах роста параллельно потреблению углеводов и увеличению количества особей происходит сдвиг значений рН от нейтральных к кислотным. После окончания потребления углеводов и достижения минимального значения рН культуральной жидкости наблюдалось ее самопроизвольное защелачивание и вторичное размножение культуры, причем второй максимум превосходил первый. Это явление объясняется активным дезаминированием аминокислот. При этом простейшие потребляют углеродные цепочки аминокислот в качестве источника углерода и энергии при отсутствии углеводов.

Переключение организма на другой тип обмена веществ сопровождается его морфогенезом: широкие ланцетовидные формы исчезают и появляются тонкие формы. Морфофизиологические и биохимические изменения можно рассматривать как приспособительную реакцию простейших в ответ на изменения условий внешней среды, что определяет высокую устойчивость этих организмов.

Развитие *A. longa* на синтетической среде Крамера — Майера с этанолом имеет свои особенности в экспонен-

циальной и стационарной фазах роста. Размножение клеток усиливается в середине экспоненциальной фазы роста, а стационарная фаза характеризуется снижением числа клеток через 24 часа после ее достижения. Фаза старения характеризуется быстрым отмиранием клетки. Низкое значение рН (3,5—4,5) не лимитирует рост этого организма. *A. longa* не способна использовать аминокислоты, которые она выделяет в среду в процессе своего развития. Таким образом, простейшие, перенесенные в культуру, развиваются быстрее, чем соматические клетки многоклеточных животных, менее требовательны к условиям внешней среды и потому перспективны для целей биотехнологии.

Биологически активные вещества простейших

Возбудитель южноамериканского трипаномоза — *Trypanosoma* (*Schizotrypanum cruzi*) стала первым продуцентом противоопухолевого препарата круцина (СССР) и его аналога — трипанозы (Франция).

Изучая механизм действия этих препаратов, советские ученые (Г. И. Роскин, Н. Г. Ключева и их сотрудники), а также их французские коллеги (Ж. Кудер, Ж. Мишель-Брэн и др.) пришли к выводу, что эти препараты оказывают цитотоксический эффект при прямом контакте с опухолью и ингибируют ее опосредованно, путем стимуляции ретикулоэндотелиальной системы.

В 50-х годах сначала во Франции, а затем в СССР были организованы небольшие экспериментальные производства этих препаратов. Однако при их изучении в эксперименте и клинике были получены противоречивые результаты.

Анализ этих работ показывает, что причины этих противоречий кроются в использовании различных штаммов *T. cruzi*, неидентичности сред для ее культивирования, условий и времени инкубации культур, методов получения препаратов, доз, схем и сроков введения их в организм, в различии гистологического строения опухолей и степени их инвазии. Но главная причина неудач заключалась в отсутствии каких-либо данных о химической природе веществ, оказывающих противоопухолевое действие, неверном подходе к выбору единицы активности. Это тор-

мозило разработку рациональной технологии получения данных препаратов.

В 1961 г. появилось сообщение В. Н. Гершановича с соавторами о том, что ингибитор опухолевого роста представляет собой липопротеид, причем 60 % активности заключено в липидном фрагменте молекулы. В результате отделения липидного фрагмента от белка была получена фракция, содержащая смесь жирных кислот и стерина. При разделении этой фракции на две части, одна из которых содержала стерина, а другая — жирные кислоты, было выяснено, что только жирнокислотная фракция обладала ингибиторным действием на рост саркомы 180.

Исходя из этих данных, наше внимание было сосредоточено на сравнительном изучении состава и противоопухолевой активности липидов, выделенных из трипаносомид (*T. cruzi*, *T. lewisi* и *Crithidia oncopelti*) и свободноживущего жгутиконосца *Astasia longa*.

В составе общих липидных фракций всех изучаемых организмов содержатся основные группы липидов, свойственные всем эукариотам (организмам, имеющим истинное ядро): фосфолипиды, стерина, свободные жирные кислоты, моно-, ди-, триглицериды, эфиры стерина, воска, углеводороды. Содержание фосфолипидов составляет 30—40 % от общего количества липидов. Среди них наибольшая доля приходится на типично животные фосфолипиды: фосфатидилхолин (лецитин), фосфатидилэтаноламин (кефалин). Кроме того, у трипаносомид обнаружен сфингомиелин, характерный для нервной ткани позвоночных животных. Обращает на себя внимание стабильность качественного состава фосфолипидов независимо от состава среды и фазы роста культуры, а также воздействия экстремальных факторов.

Наибольшим количественным изменениям подвержены фракции триглицеридов, свободных жирных кислот, стерина и их эфиров. Количество внутриклеточных триглицеридов находится в прямой зависимости от содержания источника углерода и энергии в среде. При его дефиците количество триглицеридов быстро снижается. Содержание свободных жирных кислот, стерина и их эфиров увеличивается в процессе старения культур.

Большой интерес представляет состав жирных кислот жгутиконосцев. Характерной особенностью этих организмов является высокое содержание ненасыщенных жир-

ных кислот, составляющее у трипаносомид 70—80 %, а у *A. longa* — 60 % от суммы всех жирных кислот.

Ненасыщенные жирные кислоты трипаносомид представлены главным образом пальмитолеиновой, олеиновой, линолевой и γ -линоленовой. Эйкозатриеновая и арахидоновая кислоты обнаружены в небольших количествах (до 2—3 %).

Напротив, для *A. longa* характерно высокое содержание полиненасыщенных C_{20} жирных кислот: эйкозатриеновой (3—7 %), арахидоновой (15—25 %), докозапентаеновой (3—6 %), докозагексаеновой (16—20 %).

В настоящее время установлено, что у жгутиконосцев фосфолипиды и полиненасыщенные жирные кислоты имеют такой же состав и строение, как в организме человека и животных.

В мире микробов полиненасыщенные жирные кислоты не синтезируются, а многоклеточные животные или растения представляют собой более ограниченную сырьевую базу, чем простейшие, культуры которых можно получать методами биотехнологии независимо от времени года или климатических условий.

Поскольку липидный метаболизм простейших обладает относительной лабильностью, были изучены пути его регуляции. Применение к простейшим общепринятого в микробиологии приема повышения биосинтеза липидов за счет снижения содержания в среде источника азота и увеличения содержания источника углерода привело к резкому торможению или остановке роста культур.

Для создания условий направленного биосинтеза липидов в среды для культивирования жгутиконосцев добавляли предшественники и стимуляторы биосинтеза липидов: малонат, цитрат, сукцинат, цитидиннуклеотиды в сочетании с определенным режимом аэрации.

В результате создания условий направленного биосинтеза липидов было получено увеличение содержания липидов в клетках жгутиконосцев в 2 раза при изменении их соотношения в нужном исследователю направлении (Сухарева, 1980): стабилизируется содержание фосфолипидов в присутствии малоната; снижается содержание стерина у трипаносомид и эфиров стерина у *A. longa* (стерины и эфиры стерина в высоких концентрациях могут выступать как стимуляторы роста опухолей), повышается содержание ненасыщенных жирных кислот у трипаносомид. К сожалению, у *A. longa* в присут-

ствии малоната и сукцината содержание C_{20} -полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) снижается почти вдвое. В случае использования этой культуры в качестве продуцента ПНЖК стимулирующим фактором оказался режим аэрации.

Одной из важных характеристик липидных фракций клеток является величина антирадикальной активности (АРА). Эта величина, измеряемая физико-химическими методами, свидетельствует о наличии в липидах ингибиторов свободнорадикальных реакций. Кривые изменения АРА общих липидов жгутиконосцев имеют двухвершинный характер. Первый максимум наблюдается в конце лаг-фазы, а второй — в конце стационарной фазы роста. Процессы размножения и отмирания простейших сопровождаются резким падением этой величины.

Различия в величинах АРА и составе внутриклеточных липидов, наблюдаемые в цикле роста культур простейших, коррелируют с различными уровнями противоопухолевой активности этих липидов. Наибольшей противоопухолевой активностью обладают липиды, характеризующиеся максимальными значениями АРА и минимальным содержанием липоперекисей.

Однако применение общих липидных фракций в качестве лечебных препаратов представляет неудобство ввиду их нерастворимости в физрастворе. Использование органических растворителей неизменно приводит к появлению токсических эффектов.

Впоследствии нами был получен водорастворимый полусинтетический препарат — астазилид, представляющий собой комплекс эфиров сахарозы и жирных кислот, преимущественно выделенных из *A. longa*.

Для изучения активности и механизма действия этого препарата нами были применены различные модели: бислойные липидные мембраны (БЛМ), монослойные культуры почки телянка и карциномы яичника человека, иммунокомпетентные клетки — перитонеальные макрофаги.

Было установлено, что астазилид вызывает увеличение проводимости, поверхностного натяжения, а также уменьшение электромеханической стабильности БЛМ. Полученные данные позволяют предполагать, что в основе физиологических эффектов препарата лежит его значительное мембраноактивное действие. Астазилид проявляет мягкие детергентные свойства. Возможно, что увеличение проводимости и некоторая дестабилизация клеточ-

ных мембран открывают путь для проникновения внутрь клетки Ca^{++} и других ионов, играющих ключевую роль в регуляции метаболизма.

При изучении действия астазилида на культуру клеток почки теленка было установлено, что препарат увеличивает митотический индекс клеток, снижает их полиморфизм, улучшает адгезивные свойства культуры, обеспечивает более плотное сцепление с субстратом и усиление межклеточных контактов.

Интересно подчеркнуть, что препарат не обладает прямым цитотоксическим действием на культуру опухолевых клеток, а его противоопухолевое действие, изученное на 8 штаммах перевиваемых опухолей мышей и крыс, реализуется через иммунную систему.

Астазилид действует главным образом на клеточное звено иммунитета, вызывая повышение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов, увеличение способности индуцировать развитие гиперчувствительности замедленного типа и некоторых других показателей.

Препарат предотвращает гибель 60—80 % животных, зараженных бактериальными инфекциями (*E. coli*, *Ps. aeruginosa*), а также лейшманиями.

Другой группой биологически активных веществ простейших являются полисахариды. Разнообразие полисахаридов, синтезируемых простейшими, достаточно велико. По функциональной роли в протозойной клетке полисахариды можно разделить на резервные и структурные.

К резервным полисахаридам относятся полимеры Д-глюкозы — крахмал, амилопектин, гликоген и глюканы. Особый интерес представляет β -1-3 — глюкан (парамилон), характерный для эвгленоидных жгутиконосцев. Представители родов *Astasia* и *Euglena* способны к сверхсинтезу парамилона, составляющему свыше 50 % сухого остатка клеток. Этот полисахарид изучается как стимулятор иммунной системы млекопитающих. В наших опытах парамилон *A. longa* обладал выраженным противоопухолевым эффектом. Действуя опосредованно через иммунную систему, парамилон тормозит рост саркомы Эрлиха 180 на 60 % и снижает прививаемость аденокарциномы Эрлиха. Аденокарцинома Эрлиха вообще не прививалась у 50—60 % мышей, которым профилактически был введен парамилон в дозах 3 и 30 мг/кг веса животного.

Парамилон, выделенный из *A. longa*, практически нетоксичен. Выраженное иммуномодулирующее действие и

низкая токсичность этого препарата являются предпосылкой для его углубленного исследования в сочетании с препаратами прямого противоопухолевого действия, радиотерапией и другими адъювантами.

В настоящее время в мире придается большое значение производству глюканов не только для медицинских целей, но и для пищевой и текстильной промышленности. До сих пор глюканы получали из культур бактерий или морских водорослей. Эвглениды являются одним из наиболее перспективных источников этого вещества.

Структурные полисахариды, входящие в состав клеточных мембран простейших, — это гетерополисахариды, содержащие глюкозу, маннозу, ксилозу, арабинозу, рибозу, галактозу, рамнозу, фруктозу, глюкозамин. Наиболее характерными гетерополисахаридами являются маннаны, арабиногалактаны, Д-галакто-Д-маннан, фосфано-глюканы и другие.

Большой интерес представляет выяснение антигенной взаимосвязи между непатогенными и патогенными для человека видами трипаносомид. Установлено, что при введении мышам полисахаридов из культур непатогенных для человека простейших — *Herpetomonas* sp. и *Crithidia fasciculata* — повышалась резистентность животных к *T. cruzi*, возбудителю болезни Чагаса у человека. Наличие перекрестных иммунологических реакций между полисахаридами различных типов послужило основанием для вывода о том, что антигенная общность между этими веществами обусловлена не структурой полимера, а отдельными мономерами или олигомерами одинакового химического строения.

Биомасса простейших содержит до 50 % белка. Его высокая биологическая ценность заключается в том, что он содержит все незаменимые аминокислоты, причем содержание свободных аминокислот на порядок выше, чем в биомассе микроводорослей, бактерий и в мясе. Это свидетельствует о широких возможностях применения свободноживущих простейших в качестве источника кормового белка.

В препаратах круцина и трипанозы обнаружено значительное количество дикарбоновых аминокислот (18—20 %). Препараты содержат большое количество глутаминовой кислоты — 10—12 %, глицина — 10—15 %, аланина — 12—14 %. На долю этих аминокислот приходится 32—41 % от общего содержания. Количество изолейцина,

тирозина и фенилаланина составляет 2—4 %. Цистин и метионин обнаружены в следовых количествах. Гистидин составляет 1,2—3 %. Суммарное содержание основных аминокислот — лизина и аргинина составляет 9—10 %, что в 2 раза меньше общего количества дикарбоновых аминокислот.

Таковы первые шаги в изучении простейших как продуцентов биологически активных веществ.

Гистоны, серотонин, липополисахариды, липопетидоглюканы, ферменты — таков неполный перечень веществ протозойного происхождения, которые ждут своих исследователей.

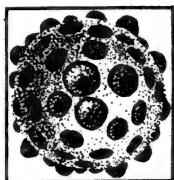
Литература

Догель В. А. Зоология беспозвоночных. — 4-е изд. — М.: Советская наука, 1947. — С. 9—68.

Кокова В. Е., Лисовский Г. М. Непропорционально-проточная культура простейших. — Новосибирск, 1976. — С. 1—74.

Серавин Л. Н. Простейшие... Что это такое? — Л.: Наука, 1984.

Сухарева Н. Н. Простейшие — продуценты биологически активных веществ // В кн.: Актуальные вопросы современной онкологии. — М.: Изд-во МГУ, 1980. — С. 158—168.



М. Э. ТАЛЪЯНСКИЙ,
доктор биологических наук

Биотехнология и безвирусное растениеводство

Практически все культурные растения поражаются вирусами. В настоящее время описано более 600 фитопатогенных вирусов, причем их список постоянно пополняется. На территории СССР зарегистрировано более 140 видов фитовирусов. Вирусы растений характеризуются значительным разнообразием формы, размеров, структуры и выражения генома.

Фитопатогенные вирусы не опасны для человека, но наносят большой ущерб сельскому хозяйству. Особенно сильно заражены вирусами те сельскохозяйственные культуры, которые размножаются вегетативным путем (клубнями, черенками, луковицами). Посевы картофеля повсеместно поражены фитовирусами: все клубни, потребляемые нами, весь товарный и почти весь семенной картофель содержит вирусы. Известно около 20 разных вирусов, поражающих растения картофеля. Заражая растения в разных комбинациях, они приводят к значительному снижению урожая. Ежегодный ущерб, наносимый только вирусами картофеля, достигает 25—50 % урожая. Продуктивность винограда, зараженного только одним вирусом короткоузлия, падает более чем на 60 %. Помимо прямого снижения урожая, вирусные инфекции нередко значительно ухудшают его качество.

Иногда симптомы вирусных заболеваний проявляются слабо или вообще отсутствуют. Продуктивность и качество урожая могут заметно снижаться и без каких-либо внешних признаков проявления болезни. В результате у многих сортов культурных растений здоровые экземпляры отсутствуют, а низкая продуктивность и их плохое качество на практике часто считаются нормальными. Если не бороться с вирусами, то состояние растений (картофеля, плодовых, ягодных, цветочно-декоративных и др.) с годами непрерывно ухудшается, урожай снижается. Это явление известно под термином «вырождение» и наблюдалось во всех странах.

Основной метод защиты растений от грибных заболеваний заключается в обработке растений фунгицидами.

Применение фунгицидов практически полностью предохраняет растение от заражения грибами или сводит заражение к минимуму. В отношении вирусных болезней такие прямые методы защиты пока отсутствуют. Основные мероприятия, приносящие в данном случае пользу, носят косвенный характер. Их проводят с целью сокращения источников болезни, снижения распространения вируса переносчиками и уменьшения действия вируса на растения.

Проблема коренного улучшения системы мероприятий по защите растений от вирусов может быть успешно решена только на основе внедрения в практику результатов фундаментальных исследований. В настоящей статье будут рассмотрены некоторые достижения и перспективы практической фитовирусологии, основанные на применении методов, взятых из таких областей науки, как молекулярная биология, иммунология, генетическая и клеточная инженерия, биотехнология.

Наиболее эффективной мерой защиты растений, очевидно, является оздоровление их от вирусов с последующим культивированием в условиях защиты от повторной инфекции. Хорошо известно, что семенной картофель, освобожденный от вирусов («безвирусный» картофель), превышает по урожайности обычный картофель на 40—80 %, а иногда и вдвое. Использование оздоровленного посадочного материала плодовых в Голландии в период с 1970 по 1980 г. позволило значительно увеличить валовой сбор плодов при одновременном резком сокращении площадей под садами.

Таким образом, дальнейшая интенсификация сельскохозяйственного производства, получение стабильно высоких урожаев возможны при использовании оздоровленного от вирусов семенного картофеля и посадочного материала других культур в условиях строгого соблюдения всех технологических приемов.

В основе безвирусного растениеводства лежит оздоровление сортов культурных растений методами культуры тканей с целью получения исходного безвирусного материала, ускоренное размножение посадочного материала черенкованием в тепличных условиях, применение методов диагностики вирусов при отборе и оценке зараженности полученных растений и проведение мероприятий по защите посадочного материала от повторной инфекции.

**Диагностика фитопатогенных вирусов —
важнейшая задача
безвирусного растениеводства**

В настоящее время предложены изящные методы культивирования ткани и выращивания растений из верхушечной меристемы, позволяющие получить здоровые растения — регенераты из исходных зараженных растений и повысить количество здоровых растений в исходном материале. Как уже указывалось выше, клетки апикальной меристемы, как правило, свободны от многих вирусов. Метод культивирования апикальной меристемы включает ряд приемов. Срезанную верхушку зараженных растений стерилизуют, и в стерильных условиях вычленяют из нее меристематическую ткань толщиной 0,2—0,3 мм. Затем эту ткань помещают на твердую питательную среду. Выращенные из апикальной меристемы растения могут быть быстро размножены путем черенкования. Следует отметить, что размер вычлененной ткани имеет важное значение для успеха работы. Чем меньше размер, тем ниже процент приживания выделенной ткани на среде. Увеличение размера приводит к уменьшению шансов полного освобождения ткани от вирусов. Последнее обстоятельство служит одной из основных причин того, что метод апикальной меристемы позволяет достигнуть лишь частичного (в среднем 30—50 %) оздоровления растений; остальные растения остаются больными. Применяемые в настоящее время химио- и термотерапевтические приемы не способны заметно повысить эффективность метода апикальной меристемы. Совершенно очевидно, что оздоровленный таким образом посадочный материал должен быть обязательно подвергнут анализу для выбраковки зараженных растений с использованием достоверных методов. В противном случае не удастся избежать повторного перезаражения здоровых растений.

Итак, главная задача безвирусного семеноводства картофеля, плодового, виноградарства и цветоводства — диагностика зараженных растений. Данная задача совсем не проста, так как часто вирусная инфекция проявляется слабо. Даже в тех случаях, когда инфекция приводит к внешнему проявлению симптомов (морщинистость, скручивание листьев, мозаика и т. п.), это происходит далеко не сразу, и длительное время зараженное растение является скрытым носителем инфекции, с которого вирус распространяется на соседние здоровые растения. В связи с этим

возникает необходимость разработки и внедрения точных и высокочувствительных методов диагностики вирусов, а также технических средств для проведения массовых анализов при выявлении больных растений. Успехи, достигнутые в семеноводстве картофеля, плодоводстве и цветоводстве ряда стран (Голландия, ФРГ, ГДР), объясняются хорошей постановкой иммунодиагностики вирусов, позволяющей в производственных условиях осуществлять постоянный контроль и выбраковку зараженных растений.

В связи с этим в течение ряда лет в Московском государственном университете совместно с рядом академических и отраслевых институтов под руководством академика ВАСХНИЛ И. Г. Атабекова ведутся исследования по созданию комплексной системы массовой диагностики вирусов сельскохозяйственных растений. При этом решаются следующие научные и научно-прикладные задачи.

1. Разработка методов выделения вирусов в виде очищенных препаратов, необходимых для получения высокоспецифических диагностических антисывороток. Эта задача вовсе не проста, принимая во внимание, что содержание вирусов в больном растении нередко составляет доли миллиграмма на 1 кг листьев, а для получения диагностических антисывороток в масштабах страны нужны сотни миллиграммов или даже граммы каждого вируса. Разработка **простых и доступных для практики** методов очистки каждого вируса занимает много времени (иногда годы) в зависимости от «трудности» объекта. Одним из основных требований, предъявляемых к препарату вируса, является отсутствие в нем примеси компонентов растения-хозяина, что совершенно необходимо для получения специфических антисывороток.

Процесс очистки фитопатогенных вирусов сводится к постепенной денатурации и удалению растительных белков, нуклеопротеидов, пигментов и др. Достигается это самыми различными методами: эмульгированием в органических растворителях, изoeлектрическим осаждением, действием тепловой денатурации. Концентрирование вирусных частиц в растительном соке часто производят осаждением в растворе полиэтиленгликоля. Важным приемом при получении чистых вирусных препаратов является дифференциальное центрифугирование, то есть чередование циклов низко- и высокоскоростного центрифугирования. Окончательная очистка вирусов достигается при центрифугировании в градиенте концентрации сахарозы и хло-

рида цезия. Некоторые вирусы весьма неустойчивы и легко разрушаются в процессе выделения. Кроме того, вирусы при выделении могут агрегировать, что в значительной степени затрудняет процесс очистки. Для предотвращения этих эффектов могут быть применены особые приемы.

В настоящее время в МГУ уже разработаны методы выделения и очистки более 30 фитопатогенных вирусов, в том числе 7 вирусов, поражающих картофель.

Новые возможности наработки вирусного антигена для последующего приготовления диагностических антисывороток открываются с развитием генетической инженерии. Появилась возможность получить клоны бактерий, содержащие в составе плазмиды ДНК-копию гена белка оболочки вируса, и добиться экспрессии этого гена в бактериальной клетке. Иными словами, можно получить форму бактерий, продуцирующих белок оболочки фитопатогенного вируса (например, вируса, поражающего картофель). Этот путь позволил бы получать в необходимых количествах вирусный белок, выращивая бактерии в ферментере. Экономически такой способ имеет явные преимущества перед традиционным. Работа в этом направлении проводится совместно Институтом молекулярной биологии АН СССР и МГУ.

2. Получение диагностических антисывороток (антител). Эта проблема также может решаться двумя путями. Получение в производственных масштабах антисывороток к вирусам (или по крайней мере к тем из них, которые трудно выделить в виде очищенного препарата) с помощью традиционных методов иммунизации животных — достаточно дорогостоящая процедура. В связи с этим представляет большой интерес метод синтеза специфических моноклональных антител с использованием гибридных мышинных клеток (гибридом). Принцип гибридомной техники заключается в следующем. В качестве партнеров для образования гибридных клеток используют иммунокомпетентные клетки (В-лимфоциты) иммунизированных животных, способные продуцировать антитела, с одной стороны, и бесконечно пролиферирующие опухолевые клетки, как бы увековечивающие «продуктивную» деятельность лимфоцитов, — с другой. С помощью специальной техники клонирования можно получить клоны гибридных клеток, способных размножаться *in vitro* и синтезировать антитела. Поскольку отдельные клоны являются потомками одного-единственного В-лимфоцита, они проду-

цируют моноклональные антитела, т. е. идентичные антитела, направленные против одной и той же антигенной детерминанты. Введение гибридных клонов в брюшную полость животного (мыши) с последующими перевивками опухолей здоровым мышам позволяет достаточно долго получать моноклональные антитела из асцитной жидкости без дополнительной иммунизации. При использовании гибридной техники для получения моноклональных антител к фитопатогенным вирусам следует отбирать клоны, продуцирующие антитела, наиболее активно реагирующие с вирусным антигеном. Применение моноклональных антител (в отличие от обычных сывороточных поликлональных) исключает возможность неспецифической реакции с компонентами растения-хозяина при постановке иммунохимических тестов. В то же время следует отметить, что, поскольку различные штаммы и изоляты одного и того же вируса могут отличаться серологически, для целей диагностики необходимо отбирать клоны гибридных клеток, продуцирующие антитела к общим для всех штаммов антигенным детерминантам.

Работа в этом направлении проводится Институтом биоорганической химии АН СССР и Институтом химической и биологической физики АН ЭССР совместно с МГУ. В настоящее время уже получены моноклональные антитела к ряду вирусов картофеля.

3. Разработка и применение высокочувствительных методов массовой диагностики вирусов. В настоящее время на практике для диагностики вирусов сельскохозяйственных растений применяют методы растений-индикаторов электронной микроскопии и ряд серологических тестов. В основе метода **растений-индикаторов** лежит способность растений отдельных видов отвечать специфической реакцией (например, образованием некрозов) на заражение определенными вирусами. Этот метод требует работы со специальными растениями, которые для своего выращивания отнимают много времени, рабочих площадей, неоправданных затрат на материалы, энергоресурсы и рабочую силу. Чувствительность метода сильно зависит от условий выращивания, от генетической чистоты растительного материала, а также от многих непредсказуемых и неконтролируемых причин, из-за которых его использование при массовых обследованиях в условиях промышленного производства, требующих высокой стандартизации и достоверности, ненадежно. Кроме того, в ряде

случаев (как, например, при диагностике вирусов плодовых) метод растений-индикаторов рассчитан на весьма длительное время (иногда годы). Таким образом, этот метод применяется только как дополнительный в некоторых частных случаях практической работы.

Электронно-микроскопический метод. Метод диагностики с помощью электронного микроскопа при массовых обследованиях трудоемок, требует дорогостоящего оборудования и использования высококвалифицированных специалистов. Кроме того, этот метод не всегда надежен, что связано с большими трудностями при дифференциации, например, сферических вирусов без дополнительной очистки от компонентов клеточного содержимого. Следовательно, отрицательный ответ в таких случаях не всегда будет соответствовать отсутствию вирусов в исходном растении. Метод электронной микроскопии оправдан при фундаментальных исследованиях, при контроле во время препаративного выделения вирусных препаратов и как дополнительный метод в некоторых сомнительных случаях, особенно при первичной идентификации новых вирусных заболеваний.

Среди методов диагностики вирусов, применяемых в сельскохозяйственной практике, особое значение сегодня имеют **методы иммунодиагностики**, обладающие высокой производительностью и позволяющие оценить большое количество растений при относительно небольших затратах труда и времени. До настоящего времени на практике применялись два серологических метода — метода капельной агглютинации и аммонийно-сульфатный метод. При капельном методе серодиагностики капля неочищенного сока растения смешивается с каплей антисыворотки на предметном стекле. При этом вирусные частицы, адсорбированные на хлоропластах, обрывках клеточных стенок, митохондриях и других клеточных компонентах, вовлекают последние в серологическую реакцию, образуя заметный агглютинат. Реакция агглютинации с неочищенным соком обладает крайне невысокой чувствительностью и может применяться только для определения вирусов, накапливающихся в листьях в высокой концентрации (вирус табачной мозаики, X-вирус картофеля). В отношении других, подчас более вредоносных, вирусов (Y-, A-вирус картофеля и многие другие вирусы) этот метод практически неприменим. Более того, следует отметить, что даже в случае вирусов, накапливающихся в листьях в достаточно

большой концентрации, возможности метода капельной агглютинации ограничены лишь тестированием вирусов в листьях взрослых растений; для клубней, луковиц и маленьких растений, выращенных в пробирках из апикальной меристемы, этот метод не эффективен, поскольку вирусы в них присутствуют в концентрации, лежащей за пределами чувствительности метода. В этой связи важно отметить, что эффективная система оздоровления растений предполагает проведение диагностики вирусов и выбраковку «вирусных» растений именно на уровне «меристемных» растений, клубней и луковиц. Последнее позволяет значительно сократить сроки получения безвирусных растений.

Аммонийно-сульфатный метод диагностики фактически является модификацией капельного метода, основанной на предварительном удалении из сока некоторых клеточных компонентов, препятствующих визуальной регистрации капельной реакции. Удаление этих компонентов достигается обработкой сока сульфатом аммония и последующим центрифугированием. Следует отметить, что аммонийно-сульфатный метод не имеет значительных преимуществ по сравнению с капельной агглютинацией и, таким образом, также практически неприменим для диагностики вирусов в условиях эффективной системы оздоровления растений.

Сравнение различных серологических тестов (табл. 1) показывает, что наиболее пригодными для практики явля-

Таблица 1

Сравнительная характеристика иммунологических методов

Название метода	Чувствительность, мкг/мл вируса	Время на анализ
Капельный метод	10	30—60 мин
Иммунодиффузия в агаре	1	24—48 ч
Латекс-тест (агглютинация)	0,01—0,1	15—30 мин
Бентонит (агглютинация)	0,1—0,5	15—30 мин
Виробактериальная агглютинация	0,1—0,5	1 мин
Иммуноферментный анализ	0,01	2—4 ч
Тест на инфекционность	0,05	Не менее 3—5 дней, месяцы, иногда годы

ются агглютинационные тесты, основанные на применении частиц латекса, бентонита, бактерий, и иммуноферментный анализ. Из множества модификаций иммунологических методов, описанных в литературе или применяемых на практике, наибольшими удобствами и преимуществами обладают разработанные в последнее время и уже опробованные на практике два метода: метод виробактериальной агглютинации (так называемый АБВ-тест) и иммуноферментный анализ (ИФА; ELISA-тест. Enzyme — linked immunosorbent assay). Первый хорош своей быстротой и простотой при достаточной для выявления вируса в зараженных клубнях чувствительности (до 0,1 мкг/мл), второй — весьма высокой чувствительностью (0,01 мкг/мл) и наглядностью, так как при положительной реакции развивается хорошо видимое цветное окрашивание (см. табл. 1).

Метод виробактериальной агглютинации (АБВ-тест). Этот тест разработан в МГУ совместно с Институтом микробиологии АН СССР и Институтом химической физики АН СССР и защищен авторским свидетельством (АС № 924099 — СССР). Метод заключается в следующем. На клеточной оболочке некоторых штаммов золотистого стафилококка (совершенно непатогенных для человека) присутствует так называемый А-протеин, который обладает способностью акцептировать неактивный конец антител-иммуноглобулинов (F_c -конец). Таким образом, при совместной инкубации стафилококка и антител образуются частицы с ориентированно расположенными антителами на поверхности. Если «заряженные» таким образом бактериальные частицы смешались с каплей исследуемого сока, то в случае присутствия в соке вируса быстро (через 1—2 мин) развивается хорошо видимая реакция: образуются белые хлопья. При отсутствии вируса капля остается равномерно мутной. Реакцию обычно проводят на стеклянных пластинах.

В настоящее время АБВ-тест уже внедрен в ряде подмосковных хозяйств. С 1984 г. предприятием «Дезинтегратор» (г. Таллин) организован выпуск диагностических комплектов для тестирования вирусов картофеля на основе АБВ-теста.

Метод иммуноферментного анализа (ИФА). Суть этого метода состоит в том, что один из компонентов комплементарной пары «антиген — антитело» ковалентно «сшивается» с каким-либо ферментом,

другой сорбируется на твердой фазе. Далее проводят реакцию нейтрализации, добавляют в субстрат, соответствующий ферменту, и определяют ферментативную активность комплекса «антиген — антитело», которая пропорциональна содержанию определяемого компонента в опытном образце. Обычно в фитовирусологии применяют три основных варианта ИФА.

1. Прямой метод. Испытуемый образец сорбируют на твердой фазе. Далее вносят антитела, меченные ферментом. Несвязавшиеся компоненты отмываются, и определяется ферментативная активность.

2. «Сэндвич-вариант». Твердую фазу сенсибилизируют специфическими антителами к определяемому вирусу, добавляют испытуемый образец, отмывают несвязавшиеся частицы, а затем вносят те же антитела, но меченные ферментом, и измеряют ферментативную активность. Количество связавшихся в данном случае меченых антител пропорционально содержанию определяемого антигена.

3. Непрямой метод. На твердую фазу наносят антиген, затем добавляют антитела к данному антигену, отмывают несвязавшиеся компоненты и добавляют антивидовые антитела, меченные ферментом, которые взаимодействуют с антителами, добавленными ранее. Так, например, если первоначально добавляют антитела кролика, то ферментом метят антитела ослы или козы, полученные к иммуноглобулинам кролика. Хотя иногда в фитовирусологии применяются и другие разновидности ИФА, предпочтение на сегодняшний день в практике отдается «сэндвич-методу», как наиболее чувствительному и специфичному.

В качестве твердой фазы для постановки ИФА наибольшее распространение получили стандартные микропласты, изготовленные из полистирола и содержащие 96 лунок для анализов.

Ковалентные комплексы антител с ферментом (конъюгаты), используемые в ИФА, должны полностью сохранять структуру активных центров как фермента, так и антител. Это достигается применением таких «сшивающих» агентов, как глутаральдегид или периодат натрия. В качестве «метки» обычно используют ферменты, катализирующие цветную реакцию, результаты которой легко регистрируются. На практике часто применяют щелочную фосфатазу и п-нитрофенилфосфат (субстрат) или пероксидазу хрена и о-дианизидин или 5-аминосалициловую кислоту. В обоих случаях в результате ферментативной реак-

ции развивается характерное окрашивание, которое заметно на глаз и может быть количественно измерено на спектрофотометре.

Важно отметить, что ИФА обладает целым рядом преимуществ по сравнению с другими способами серологического тестирования вирусных болезней растений и прежде всего высокой чувствительностью, которая на 2—3 порядка превосходит возможности методик, обычно применяемых в настоящее время, и приближается к чувствительности радиоиммунологического анализа. Для индикации требуется минимальное (до нескольких мг) количество растительного материала. Инфицированную ткань можно брать из самых различных органов растений, практически не повреждая их. Таким образом, возможен контроль и многолетних плодовых растений, и рассады, и семенного фонда (клубней, луковиц, «меристемных» растений).

Метод ИФА уже внедрен в НИИ картофельного хозяйства, в совхозе «Оранжерейный комплекс», в колхозе «Ярва-Яани» ЭССР и во многих других учреждениях. В НИИ картофельного хозяйства на основе совместных разработок с МГУ и ВНИИ прикладной молекулярной биологии и генетики ВАСХНИЛ впервые в СССР организован выпуск диагностических комплектов к вирусам картофеля на основе ИФА и поликлональных антител. Колхоз «Ярва-Яани» Эстонской ССР впервые в практике безвирусного семеноводства картофеля приступил к выпуску диагностических комплектов к вирусам картофеля на основе ИФА и моноклональных антител, полученных с помощью гибридной техники по технологии, разработанной совместно с Институтом химической и биологической физики АН ЭССР и МГУ.

Таким образом, в результате проделанной работы в СССР уже начат массовый выпуск диагностических комплектов на основе ИФА к ряду наиболее важных вирусов картофеля: X, Y, M, F и вирусу скручивания листьев.

Новые методы иммунодиагностики позволили полностью освободить от вирусов исходный посадочный материал в НИИ картофельного хозяйства. В опытах этого института использование картофеля, оздоровленного с применением ИФА-диагностики, обеспечило значительное увеличение урожая (иногда удвоение).

Работа по дальнейшему усовершенствованию и созданию принципиально новых методов диагностики вирусов

сельскохозяйственных растений продолжается. Институтом молекулярной биологии АН СССР совместно с МГУ разрабатывается новый неиммунологический метод диагностики вирусов на основе применения молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот. С этой целью созданы клоны бактерий кишечной палочки, в плазмиды которых введены ДНК-копии 3'-концевой части РНК X- и Y-вирусов картофеля. Таким образом, для получения основного материала диагностикумов — ДНК-копий вирусного генома будет достаточно наращивать полученные клоны бактерий в производственных ферментерах. Гибридизационный анализ, вероятно, заменит в будущем серодиагностику фитопатогенных вирусов, для проведения которой необходимо постоянно получать антитела с использованием лабораторных животных (кроликов, коз, мышей и др.).

4. Автоматизация массовой диагностики вирусов. Массовая диагностика невозможна без применения технических средств для проведения анализов. Чтобы оценить общий объем работы, необходимо отметить, что даже сейчас в семеноводческих хозяйствах страны проводится ежегодно 5—15 млн. анализов. При хорошей постановке работы следует анализировать на зараженность разными вирусами сотни миллионов растений картофеля, плодовых, гвоздики, хризантем, винограда и др.

В течение ряда последних лет в МГУ совместно с предприятием Министерства электронной промышленности СССР разрабатываются приборы для автоматизации процессов взятия проб (листьев, клубней, луковиц), получения сока или экстракта, проведения иммунологических анализов и регистрации результатов реакции. Это очень непростая и весьма важная часть общей проблемы связана с разработкой, проектированием и изготовлением разных моделей приборов для иммунодиагностики. Одна из моделей прошла успешные испытания в НИИ картофельного хозяйства.

Таким образом, в нашей стране созданы все необходимые предпосылки для широкого внедрения эффективной системы безвирусного растениеводства. Однако следует подчеркнуть, что проблема оздоровления сельскохозяйственных растений от вирусов может быть полностью решена только при проведении важных организационных мероприятий, направленных на создание государственной службы диагностики вирусов, контроля и сертификации семенного и посадочного материала.

Реализация в полном объеме мероприятий, основанных на оздоровлении, массовой диагностике вирусов в посадочном материале и его сертификации, позволит повысить урожайность важнейших сельскохозяйственных культур не менее чем на 25 % в масштабе всей страны.

Интерферон человека и защита растений от вирусов

Очевидно, что мероприятия по борьбе с вирусными болезнями сельскохозяйственных растений не должны ограничиваться только получением безвирусного посадочного материала. Необходимо еще защитить оздоровленные растения от повторных инфекций. Усовершенствование и создание новых профилактических, а по возможности и терапевтических приемов имеют возрастающее значение еще и потому, что существующие методы оздоровления растений нуждаются в коренном улучшении, поскольку их эффективность, как уже указывалось, не превышает обычно 30—50 %. Важное значение в этой связи приобретает поиск активных и специфичных ингибиторов репродукции фитовирусов. В отличие от грибных болезней, в борьбе с которыми системные фунгициды открыли большие возможности, терапевтические и профилактические меры борьбы с вирусными инфекциями крайне ограничены. Хотя в настоящее время и описаны десятки ингибиторов фитовирусов, ни один из ингибиторов пока еще не нашел широкого применения в сельскохозяйственной практике. Последнее в большой степени обусловлено тем, что репродукция вирусов тесно связана с процессами, происходящими в клетке, и вещества, блокирующие эту репродукцию, с большой вероятностью могут повреждать сами растения. Среди ингибиторов фитопатогенных вирусов, нашедших локальное применение в ограниченных масштабах, можно упомянуть 2-тиоурацил, 8-азагуанин и некоторые другие. В последние годы внимание ряда исследователей привлекает препарат рибовирин (виразол). Его активность, однако, оказалась неодинаковой на разных растениях-хозяевах. Кроме того, этот препарат, так же как и предыдущие, не лишен фитотоксичного эффекта. Не более высока эффективность и термотерапевтических приемов в отношении вирусов растений.

Определенный интерес в связи с этим вызывает работа, выполненная Села и сотрудниками (1981) и показав-

шая, что нативный и рекомбинантный (полученный методами генетической инженерии) лейкоцитарный интерферон человека подавляет репродукцию вируса табачной мозаики в клетках табака. Интерферон был открыт Айзексом и Линденманом в 1957 году. Этот препарат нашел сейчас широкое применение в борьбе с вирусными инфекциями человека. Интерферон имеет белковую природу и может индуцироваться в клетках человека и животных вирусами и двунитевыми РНК. В свою очередь, интерферон стимулирует в животных клетках продукцию «необычных» 2' — 5'-олигоаденилатов (2—5А), обладающих собственно противовирусной активностью. Образование 2—5А лежит в основе одного из механизмов противовирусного действия интерферона. В последние годы в растениях табака был обнаружен белок (так называемый антивирусный фактор — АВФ), функционально сходный с интерфероном. АВФ, так же как интерферон, обладает противовирусной активностью и вызывает образование олигоаденилатов в клетках растений. В то же время важным различием между действием интерферона в животных клетках и АВФ в растениях является то, что интерферону свойственна достаточно строгая видовая специфичность, иными словами, он сохраняет активность в клетках животных того вида, из которых он был выделен. С другой стороны, АВФ в растениях видовой специфичностью не обладает. В связи с этим результаты, свидетельствующие о подавлении интерфероном репродукции фитовируса, вызвали определенный скептицизм. Однако в нашей лаборатории эти данные были подтверждены. Более того, было показано, что лейкоцитарный интерферон человека подавляет репродукцию и других фитопатогенных вирусов в различных растениях: Х-, У-, F-, М-вирусов картофеля и даже вирусов шампиньонов.

Этот эффект приводит к тому, что в листьях зараженных растений, содержащих значительные количества вируса, концентрация вируса может значительно уменьшаться при обработке интерфероном в том случае, если данный вирус является нестабильным (т. е. скорость распада его достаточно велика, а образование новых вирусных частиц блокировано интерфероном). В то же время следует отметить, что противовирусный эффект интерферона в отношении вирусов растений находится в «странной» зависимости от дозы. Как при уменьшении, так и при увеличении концентрации интерферона относительно

оптимальной эффективностью его противовирусного действия резко снижается. Последнее обстоятельство несколько снижает возможности практического применения интерферона в растениеводстве, хотя и не исключает их полностью, тем более что в системе Минмедмикробиопрома СССР начато производство относительно недорогого отечественного препарата рекомбинантного интерферона.

Возможно, полезными для практических целей окажутся интерфероноподобные белки растений. Следует, однако, отметить, что пути производства этих белков в больших масштабах пока кажутся малореальными.

Поиск новых высокоспецифичных ингибиторов репродукции вирусов, вероятно, будет продолжен в ближайшее время. Возможно, перспективными в этом плане окажутся олигоаденилаты и некоторые другие соединения, изучение которых начато в МГУ совместно с Институтом молекулярной биологии АН СССР.

Устойчивость растений к вирусным болезням

Получение и выращивание сортов растений, устойчивых к вирусам, — один из наиболее экономически выгодных способов защиты растений. В настоящее время проводится довольно большая работа по селекции вирусоустойчивых сортов сельскохозяйственных культур. Следует, однако, отметить, что эта работа ведется, в общем-то, вслепую, без понимания тонких механизмов, контролирующих устойчивость растений. Исследование факторов, определяющих устойчивость растений к вирусным болезням, позволит не только в значительной степени усовершенствовать селекционный процесс, но и найти пути к созданию стойкого индуцированного иммунитета у растений.

Из общих соображений можно полагать, что механизмы, определяющие успех или неудачу вирусной инфекции, могут функционировать на любой стадии репродукции вирусов: 1) на первых фазах инфекции — проникновении, адсорбции вирусных частиц на клеточных рецепторах и освобождении нуклеиновой кислоты от вирусной оболочки; 2) при репликации и трансляции вирусной РНК; 3) при системном распространении вируса из первично-зараженных клеток в соседние здоровые клетки; 4) во время сборки зрелых вирусных частиц.

Ранее в МГУ было установлено, что в отличие от вирусов животных, круг хозяев которых может определяться на уровне механизма адсорбции вируса, первые стадии инфекционного процесса, очевидно, не играют существенной роли в контроле круга хозяев фитопатогенных вирусов. Устойчивость растений, вероятно, проявляется на более поздних этапах инфекционного процесса.

В МГУ при исследовании процесса распространения вирусной инфекции из клетки в клетку (транспорта вирусной инфекции) было показано, что вирус при заражении растений попадает в очень небольшое число первично-зараженных клеток. Если репродукция данного вируса в первично-инфицированных клетках растения блокирована (и вирус лишен даже возможности размножаться в клетках данного вида), то устойчивость этого типа можно определить как экстремальную. Причиной блокирования инфекции в этом случае может быть, например, отсутствие необходимых факторов для репликации вирусных РНК или образование неких клеточных веществ, репрессирующих вирусную репродукцию. Экстремальная устойчивость наблюдается, например, при заражении растений томатов, содержащих ген $T_m - 1$, вирусом табачной мозаики, а также растений редиса и турнепса вирусом мозаики костра. Значительно шире распространен факультативный тип устойчивости растений, при котором вирус оказывается способным к репродукции в первично-зараженных клетках, однако транспорт его в соседние клетки в данном растении блокирован. Поскольку число первично-зараженных клеток бывает крайне невелико, растения в данном случае являются практически здоровыми и ущерб им вирусом не наносится. Недавно в нашей лаборатории было показано, что устойчивость растений к вирусу, основанная на блокировании транспорта, может быть преодолена в присутствии вируса-помощника при совместной инфекции. Таким образом, различные сельскохозяйственные растения, по-видимому, могут в определенных случаях приобретать восприимчивость к непатогенным для них (в норме) вирусам. Вероятно, именно с этим явлением нередко встречаются на практике, когда устойчивые к вирусу табачной мозаики формы томатов поражаются этим вирусом в присутствии X — вируса картофеля. Это обстоятельство существенно увеличивает опасность смешанных вирусных инфекций для растениеводства.

Широко известно явление индуцированной устойчивости растений к вирусам. Показано, в частности, что заражение растений слабым штаммом того или иного вируса может предохранять его от повторного заражения суровым штаммом того же вируса. Этот прием, известный под названием «вакцинация», нередко используется в сельскохозяйственной практике. Применяя этот метод, следует учитывать, что растения, искусственно зараженные слабым штаммом какого-либо вируса, могут быть впоследствии поражены не только штаммом того же вируса, но и совершенно иным вирусом. В этом случае может возникнуть опасность так называемого синергического взаимодействия между вирусами, при котором размножение одного (или обоих) из вирусов-партнеров резко стимулируется. Принимая во внимание данное обстоятельство, следует, по-видимому, проводить «вакцинацию» растений в контролируемых условиях (вероятно, ограничив их закрытым грунтом).

Генетическая инженерия и вирусы растений

Генетическая инженерия предполагает введение новых генов (и их экспрессию) в различные организмы. В основе генетической инженерии лежит технология получения рекомбинантных ДНК (РНК): определенный участок ДНК «вырезается» с помощью рестрикционных эндонуклеаз и присоединяется (лигируется с использованием фермента лигазы) к другой молекуле ДНК (вектору), которая способна к репликации. Конструирование векторов предполагает наличие в них регуляторных последовательностей, контролирующих репликацию и трансляцию (продукцию мРНК). Важной проблемой генетической инженерии является также селекция и идентификация рекомбинантных молекул ДНК. В случае плазмидных векторов участки клонирования генов часто располагают внутри генов устойчивости к антибиотикам. Таким образом, бактерии, имеющие рекомбинантную плазмиду, становятся устойчивыми к антибиотикам, на чем и основан принцип селекции.

К настоящему времени уже достигнуты значительные успехи в генетической инженерии прокариот, у которых в качестве векторов обычно используют бактериальные плазмиды и ДНК бактериофагов. Получены клоны бакте-

рий, продуцирующие самые различные экономически важные продукты: инсулин, гормон роста, интерферон человека и многие другие. Теперь все они производятся методом микробного синтеза.

Генетическая инженерия растений пока еще только зарождается, однако перспективы ее трудно переоценить. Особый интерес представляет, очевидно, введение в геном культурных растений генов, контролирующих устойчивость к патогенам (в том числе и вирусам) и вредителям, последовательностей, повышающих питательную ценность белка, генов некоторых бактерий, ответственных за азотфиксацию, и многих других. Поскольку регуляторные области, ответственные за репликацию и транскрипцию (промоторы) ДНК прокариот и эукариот, в значительной степени различаются, возникает серьезная проблема выбора векторных систем для растений. В качестве одного из векторов предполагается использовать бактерию *Agrobacterium tumefaciens*, вызывающую корневой рак (корончатый галл) у широкого круга двудольных растений. Вирулентность этих бактерий обусловлена присутствием так называемой Ti-плазмиды, сегмент которой (Т-ДНК) во время инфекции включается в ядерную ДНК растения-хозяина. Таким образом, гены, введенные в Ti-плазмиду, могут быть интегрированы с хромосомой растительной клетки.

В качестве векторов для растений, по крайней мере вегетативно размножающихся, могут быть, вероятно, использованы также фитовирусы. При этом следует подчеркнуть, что для этих целей пригодны не только ДНК-(каулимовирусы, геминивирусы), но и РНК-содержащие вирусы. Действительно, методы направленного «разрезания» РНК с использованием РНКазы-Н и «сшивания» РНК с помощью РНК лигазы, разработанные в Московском университете, открывают принципиально новые возможности в генетической инженерии на молекулах РНК.

В качестве векторов могут быть, по-видимому, использованы слабо патогенные и латентные вирусы. Такие векторы должны непременно содержать ген РНК-репликазы и соответствующие регуляторные области РНК, необходимые для репликации. В качестве векторов желательно использовать вирусы с широким кругом растений-хозяев. Для успешного функционирования вектор, построенный на основе фитовируса, должен содержать вирусспецифический ген «транспорта», обеспечивающий распростране-

ние вектора из клетки в клетку. Важнейшей задачей при использовании фитовирусов в генно-инженерных исследованиях является получение векторных систем, не приносящих вреда растению. С этой целью гены (ген) вирусов, определяющих патогенность (а их еще предстоит идентифицировать), следует удалять или модифицировать в составе вектора.

Итак, вирусам, вероятно, предстоит внести весомый вклад в развитие генно-инженерных работ на сельскохозяйственных растениях.

В настоящей статье был рассмотрен ряд проблем прикладной фитовирусологии. Одни из них (как, например, проблема оздоровления сельскохозяйственных растений от фитопатогенных вирусов) уже близки к полному решению и широко внедряются в практику сельского хозяйства. Другие (например, конструирование векторных систем на основе фитовирусов для генетической инженерии растений) только возникают. Однако успешное решение всех рассмотренных проблем зависит от использования результатов и методов фундаментальной науки: молекулярной биологии, иммунологии, генетической и клеточной инженерии, биотехнологии.

Литература

Атабеков И. Г. Иммунодиагностика вирусов растений — резервные миллиарды в сельском хозяйстве // В кн.: Биотехнология. — М.: Наука, 1984. — С. 234—238.

Бобкова А. Ф., Чирков С. Н. // Сельскохозяйственная биология. — 1983. — № 5. — С. 32—35.

Метьюз Р. Вирусы растений. — М.: Мир, 1973.

Огарков В. И., Каплан И. Б., Тальянский М. Э., Атабеков И. Г. Подавление репродукции вирусов картофеля под влиянием интерферона человека // Докл. АН СССР. — 1984. — Т. 276. — № 3. — С. 743—745.

Чирков С. Н., Оловников А. М., Сургучева Н. А. и др. Виробактериальная агглютинация (АБВ-тест) — новый метод иммунодиагностики вирусов сельскохозяйственных растений // Докл. ВАСХНИЛ. — 1981. 7. — С. 9—12.

Atabekov J. G., Dorokhov Yu. Z. Plant virus-specific transport function and resistance of plants to viruses. Adv. in virus research, 29, 313—364. (1984).

Hull R., Davies J. W. Genetic engineering with plant viruses, and their potential as vectors. Adv. in virus research, 28, 1—33 (1983).



А. Х. ТАМБИЕВ,
кандидат биологических наук

Новое направление в альгологии

Человек с древнейших времен имеет дело с водорослями. Возможно, когда охота и собирательство были главным источником существования первобытных людей, то уже тогда, передвигаясь вдоль морского побережья, они научились различать съедобные и несъедобные водоросли. Поэтому пищевые свойства водорослей прежде всего привлекали к ним внимание.

И сейчас можно сказать, что не менее 100 видов макрофитных водорослей употребляется в пищу как в странах Европы и Америки, так и особенно на Востоке. Из них готовят много разнообразных блюд, в том числе диетических, салатов, приправ. Их подают в виде засахаренных кусочков, своеобразных конфет, из них варят варенье, делают желе, добавки к тесту и многое другое. В магазине можно купить консервы из морской капусты — ламинарии дальневосточных или северных морей. Ее консервируют с мясом, рыбой, овощами, рисом, употребляют при приготовлении супов и др. Она наряду с микроводорослью хлореллой является самой популярной съедобной и кормовой водорослью. В последние годы ей пришлось потесниться, уступая место синезеленой микроводоросли спиролине, которая также стала широко использоваться в пище. Свое шествие спиролина (*Spirulina platensis*) начала из Африки — население района озера Чад давно употребляет ее в пищу, называя этот продукт «дихе».

Другое место, откуда начала распространяться спиролина, но иного вида (*Spirulina maxima*) — воды озера Тескоко в Мексике. Еще в XVI в. ацтеки использовали спиролину в пищу в виде лепешек. Как озеро Тескоко, так и водоемы района озера Чад имеют в воде очень высокое содержание щелочей. Характерно, что в таких озерах спиролина полностью доминирует и растет почти как монокультура — составляет в отдельных озерах до 99 % общего количества водорослей.

Ее собирают также из озер около г. Мехико, получая до 2 т сухого веса биомассы водоросли в сутки, и эта продукция рассылается в США, Японию, Канаду. В других

странах спирулину культивируют обычно в искусственных водоемах или специальных емкостях.

Клетки спирулины содержат много высококачественного белка, приближаются по составу аминокислот к лучшим белковым стандартам, установленным ФАО. В белке присутствует 9 незаменимых и столько же других аминокислот, что делает спирулину исключительно ценным пищевым продуктом. Белковый корм из нее для лабораторных животных давал при проверке очень хорошие показатели роста и не обладал при этом токсичностью, которая присутствует у других видов синезеленых водорослей.

Спирулину можно культивировать в открытых прудах или, как в Италии, в замкнутой системе из полиэтиленовых труб. Урожайность очень высокая: получают до 20 г сухой массы водоросли с 1 м² в день, а расчеты на год показали, что она превысит выход пшеницы примерно в 10 раз. Преимущества спирулины по сравнению с другими съедобными водорослями не только в простоте культивирования, но и в несложности сбора биомассы, высушивания ее, например, под солнцем.

В ряде стран выращивают спирулину вида *Spirulina platensis*. Недавно было показано, что в клетках спирулины, помимо ценного белка, углеводов, липидов, витаминов, в значительных количествах запасается, например, такое ценное вещество, как поли-β-оксибутират.

Известны и другие съедобные макрофитные водоросли — ульва, из которой делают разные зеленые салаты, а также алария, порфира, родимения, хондрус, ундария и др. В Японии продукты, получаемые из ламинариевых, называют «комбу», и для того, чтобы их вкусно приготовить, существует более десятка способов. Из красных водорослей родимении и порфиры делают превосходные красные морские салаты (в отличие от зеленых из ульвы). В Японии они давно имеют свои названия — аманори, хошинори и т. д. Культивирование порфиры там занимает 60 тыс. га акватории, давая ежегодную продукцию на 730 млн. долларов. У нас в кондитерской промышленности применяют для изготовления пастилы сырье из фуруцеллярии (фуруцеллан).

При завоевании племен майя миссионерами описывался случай, когда испанцы около полутора лет осаждали крепость на вершине горы. Естественно, что все продукты давно должны были кончиться, однако крепость не сдавалась. Когда же она была наконец взята, то испанцы с

удивлением увидели в ней небольшие пруды, где культивировались одноклеточные водоросли, из которых индейцы готовили особый сыр. Испанцы попробовали его и нашли весьма приятным на вкус. Однако это было уже после того, как испанцы уничтожили абсолютно всех защитников и секрет племени был утерян. В наше время делались попытки определить этот вид водорослей, из которых готовился сыр, но они не увенчались успехом.

Имея дело с богатейшими биологическими ресурсами Мирового океана, человек в общей сложности использует ежегодно 60 млн. т животной и 10 млн. т растительной продукции, и развитым промыслом охвачено около 200 видов животных и 80 видов растений.

В целом ряде стран водоросли используют как весьма полезную витаминную добавку к кормам для сельскохозяйственных животных. Их прибавляют к сену или дают как самостоятельный корм для коров, лошадей, овец, коз, домашней птицы во Франции, Шотландии, Швеции, Норвегии, Исландии, Японии, Америке, Дании и на нашем Севере.

Добытые водоросли (ламинариевые, фукусовые и др.) промывают, сушат на берегу, прессуют и складывают в сараи и амбары. Перед употреблением их обдают горячей водой или просто замачивают. Животным скармливают в виде добавки также биомассу выращиваемых микроводорослей (хлорелла, сценедесмус, дюналиелла и др.).

Наряду с кормами водоросли давно применяют в сельском хозяйстве в качестве удобрений. Биомасса обогащает почву фосфором, калием, йодом и значительным количеством микроэлементов, пополняет также ее бактериальную, в том числе азотфиксирующую, микрофлору. При этом в почве водоросли разлагаются быстрее, чем навозные удобрения, и не засоряют ее семенами сорняков, личинками вредных насекомых, спорами фитопатогенных грибов.

По берегам наших северных морей, например Белого моря, водоросли собирают, особенно после штормов, и вывозят на поля как в свежем, так и в сухом виде. Собрать их несложно — сотни тонн ценного сырья лежат на берегу. В Архангельской области водоросли собирают колхозники, выходя часто целыми семьями, и бригады рыбаков. Сырье, сданное в приемные пункты, поступает на Архангельский опытно-промышленный водорослевый комбинат. В г. Беломорске цех по переработке водорослей, получая

от заготовителей за сезон (лето и осень) около 3 тыс. т сухих водорослей, вырабатывает в месяц до 200 т фукусной крупки для нужд медицины и животноводства. Потребность в продукции большая, ее отправляют в различные районы страны: на Украину, в Подмосковье, Казахстан, Краснодарский край и др.

Водоросли богаты витаминами А, С, D, более всего витаминами группы В, калием, мышьяком, натрием, бромом и особенно йодом. Впервые йод был выделен из водорослей в 1812 г., а уже в 30-х годах прошлого века во Франции возникла йодная промышленность. Через некоторое время она возникла и в Англии. В нашей стране производство йода началось в годы первой мировой войны на йодных заводах в Архангельске, Одессе и на Дальнем Востоке. Из черноморских водорослей богаче всех йодом филлофора, которую начинали добывать с так называемого «филлофорного поля», сейчас сильно обедневшего. Золу от водорослей после добычи йода также используют в качестве удобрения. В последнее время из нее стали получать калий и натрий.

Одним из самых ценных продуктов, получаемых из красных водорослей, является агар — полисахарид, присутствующий в их оболочках и состоящий из агарозы и агаропектина. Количество его доходит до 30—40 % от веса водорослей. Ценность агара как природного вещества определяется его способностью образовывать гель: его получают вываркой водорослей и рядом других операций, тогда он переходит в воду и застывает в виде буро-желтого (менее очищенного) или белого геля.

Агар известен в Японии с 1760 г., а в 1918 г. там работал 381 завод, производящий агар и близкие к нему продукты. До 40-х годов нашего века источником агара на Востоке были в основном красные водоросли лауренция и грацилярия, гелидиум. Сейчас список продуцентов агара значительно расширился и включает только в Японии около 30 видов агароносных водорослей.

Водоросли — единственный источник получения агара, агароидов, каррагинина, альгинатов. В мире в 1980 г. было получено 7 тыс. т агара, 222 тыс. т альгинатов, 10 тыс. т каррагинина.

Применение агара получило сейчас широкое распространение. Агаровый гель плавится при 90 °С, застывает при 45 °С и практически не гидролизуются микроорганизмами. Он составляет основу всех твердых микробио-

логических сред. Успехи медицинской и промышленной микробиологии, производство лекарств, ферментов, гормонов и других ценных веществ во многом зависят от наличия и качества агара. По этой же причине он необходим для многих исследовательских работ. Агар добавляют в кондитерские изделия — желе, мармелад, конфеты, конфитюры, а также во фруктовые соки, которым он не дает засахариваться. На московской кондитерской фабрике недавно стали добавлять в зефир агаровую фракцию фуцеллан. Прибавка агара в хлеб дольше сохраняет его свежим. В мясных и рыбных консервах он дает желе.

В бумажной промышленности агар используют для придания особого блеска высококачественной бумаге. Агаровый клей при добавке к строительным и текстильным материалам повышает их прочность и придает водоотталкивающие свойства. В 20-х годах нашего века в Японии в значительных количествах производился «фунори» — клей на основе агара из красных водорослей, применявшийся для укрепления цемента и штукатурки и идущий и в текстильную промышленность.

Широко применяют агар в медицине: как слабительное при расстройствах пищеварительного тракта, делают на нем таблетки и капсулы с различными лекарствами и витаминами, готовят мази и эмульсии. Агар превосходит животный желатин, имеющий иное строение, по устойчивости к температуре.

В нашей стране основным источником агара служит красная водоросль анфельция. Требования к агару, идущему в медицинскую промышленность, весьма высоки. Агар не должен содержать посторонних примесей, включений и загрязнений, иметь плесени и микробиологическую порчу. У нас выпускается белый вымороженный агар высшего качества. Один из его основных производителей — агаровый цех рыбконсервного завода в сахалинском городе Корсакове. Цех работает на анфельции, поставляемой рыболовецким колхозом, и дает продукцию, временами превосходящую по качеству даже мировые стандарты. Из анфельции получают агар и на Белом море.

Однако нарастающий дефицит агара, особенно агара высшего качества, привел к возникновению у нас «агаровой проблемы». Она возникла в результате ряда причин. Прежде всего это сокращение производства агара с 245 т в 1975 г. до 125 т в 1981 г. Например, производство белого агара на Сахалине, постепенно уменьшаясь за последние

25 лет, к 1985 г. сократилось в 2,5 раза. В агаровом цеху в г. Корсакове используют устаревшее оборудование и не менявшуюся в течение многих лет технологию. Скажем, с момента начала обработки анфельции и до получения готовой продукции — белого агара проходит почти полгода. А выморозку агара ведут под открытым небом, что значительно ухудшает его качество.

Добычу же анфельции ведут такими способами, как, например, рыбонасосами, которые подрывают ее запасы. Чтобы эта водоросль восстановилась до размера, когда ее можно использовать, необходимо не менее семи лет, а прирост ее составляет всего 1,5—2 см в год.

Гораздо выгоднее с точки зрения сохранения экологического равновесия собирать водоросль на берегу в зоне прилива. Но этот способ труден, менее производителен, не механизирован, требует ручного труда и не пользуется особым успехом. К тому же населенные пункты, как правило, удалены от скоплений водорослей. Добытые водоросли нужно еще высушить, а потом транспортировать на значительное расстояние в место переработки. В сырье, например, анфельции с естественных полей входит до 50 % примесей и различных обрастаний, которые можно отделить лишь с помощью ручного труда. И хотя на Сахалине планируется реконструкция производства белого агара и доведение его выхода до 100 т в год, до конца не ясно, удастся ли этого достигнуть на фоне сильно сократившегося количества анфельции и загрязнения ее полей.

Более организованно идет сбор выброшенных водорослей на Белом море, там они в основном расходуются для нужд сельского хозяйства, но там же налажено и производство агара.

Кроме агара, к фикоколлоидам красных водорослей относятся каррагинин и агароид. Каррагинин — сульфатированный полисахарид добывают из водорослей хондрус и гигартина. В Северной Ирландии начали впервые использовать хондрус, поэтому он получил название «ирландский мох». Каррагинин используется в пищевой, бумажной и текстильной промышленности. Близкий к агару агароид получают у нас из черноморской водоросли филлофоры.

Бурые водоросли являются единственным источником получения одних из самых ценных веществ водорослей — солей альгиновой кислоты, альгинатов. Альгиновая кислота — линейный гетерополисахарид, постро-

енный из связанных остатков β — D-маннурановой и α — L-гулурановой кислот. Альгинаты исключительно широко применяются в народном хозяйстве. Тут и изготовление высококачественных смазок для трущихся деталей машин, медицинские и парфюмерные мази и кремы, синтетические волокна и пластики, стойкие к любой погоде лакокрасочные покрытия, невыцветающие со временем ткани, производство шелка, клеящих веществ исключительно сильного действия, строительных материалов, пищевые продукты отличного качества — фруктовые соки, консервы, мороженое, стабилизаторы растворов, брикетирование топлива, литейное производство и многое другое. Альгинат натрия — наиболее используемое соединение — способен поглощать до 300 весовых единиц воды, образуя при этом вязкие растворы.

Бурые водоросли богаты также весьма полезным соединением — шестиатомным спиртом маннитом, который с успехом применяют в пищевой промышленности, фармацевтике, при производстве бумаги, красок, взрывчатки и др. Бурые водоросли в ближайшее время планируется использовать для получения биогаза.

Если брать общие потребности народного хозяйства в важнейших видах продукции из водорослей, не учитывая потребности сельского хозяйства, то они удовлетворяются в настоящее время примерно на 12 %. Это приводит к необходимости закупать агар, альгинаты и другие желирующие вещества ежегодно за рубежом более чем на 15—20 млн. валютных рублей. При этом в мире наблюдается увеличение спроса на них, в связи с чем за последние 8 лет стоимость, например, альгината натрия возросла в 1,5 раза, пищевого агара — в 2,5 раза.

Кроме пищевого и кормового значения, а также использования в качестве источников перечисленных полезных веществ, водоросли могут иметь промышленное значение в плане получения из них ацетона, сложных эфиров, органических кислот, спиртов, а также биомасса их применяется в медицине. Морская капуста (ламинария), являясь пищей, оказывает к тому же лечебное и профилактическое действие при нервных расстройствах, заболеваниях пищеварительной системы, цинге, склерозе, развитии зоба и др. У нас еще в 30-х годах начал выпускаться лечебный препарат из ламинарии в виде порошка. Сейчас бурые водоросли применяют при получении противосвертывающих препаратов и заменителей крови. Известно

противогельминтозное действие водорослей энтероморфа, церамииум, гелидиум, кораллина.

Общая добыча морских промысловых водорослей достигает в мире 3 млн. т в год, из которых 2,2 млн. т выращивается в хозяйствах маpикультуры. При этом в 1980 г. более всего водорослей было выращено в КНР — 1441 тыс. т, Японии — 425 тыс. т, затем следуют Южная Корея, Филиппины, о. Тайвань. В других странах (США, Франция, Италия и др.) проводится в основном экспериментальное выращивание, лишь в отдельных случаях достигающее сколько-нибудь заметного промышленного уровня.

Из видов более всего культивируют ламинариевые водоросли — ламинарию японскую, ундарию, макроцистис, в экспериментальных масштабах — аларию, саккоризу, другие виды ламинарий. В КНР выращивают наибольшее количество в мире ламинарии японской: 280 тыс. т сухой биомассы в год, средний урожай — 15 т сухой массы с гектара; ее продвигают все больше на юг и осваивают новые районы. Гигантская ламинариевая водоросль макроцистис является очень перспективной, например, для культивирования у Тихоокеанского побережья США, заинтересовались макроцистисом в КНР. Эта водоросль характерна тем, что способна накапливать питательные вещества и использовать их, когда происходит обеднение морской воды.

Из красных водорослей в промышленном масштабе культивируют агароносные виды — грацилярию, содержание агара в которой доходит до 30 % и более, максимальная продуктивность 12 т с гектара. Некоторые виды грацилярии широко употребляют в пищу на Карибских островах и в Вест-Индии. На коралловых рифах в основном на Филиппинах культивируют эухему (получено в 1982 г. 109 тыс. т красных водорослей, более всего эухемы), содержащую до 50 % сухого веса каррагинина.

В связи с широким применением водорослевого сырья, а также различных ценных продуктов, получаемых из него, возникает потребность разработать такие методы культивирования макрофитных водорослей, которые дали бы возможность получать необходимое автономно, т. е. в лаборатории, и при этом круглогодично. Подобное культивирование не будет зависеть от сезона, и тут можно применить весь широкий, накопленный опытом набор культивационных приемов воздействия и, варьируя условия, отрабатывать эффективные способы выращивания, подоб-

но тому как это разрабатывалось и проводилось с культурами тканей и клеток высших растений (Бутенко, 1964). Результатом будет получение культур тканей и клеток макрофитных водорослей, в первую очередь полезных в промышленном и пищевом отношении.

В оптимальной перспективе это могло бы заменить добычу водорослей, которая затруднена, становится все более сложной и вызывает ряд нежелательных сдвигов в морских биоценозах, и даже в какой-то мере заменить выращивание макрофитных водорослей в хозяйствах ма-рикультуры. Изолированные ткани и клетки высших растений, растущие в культуре, как показано, могут быть удобным объектом для изучения стимуляции роста, размножения и служить источником получения ценных продуктов клеточного метаболизма (Бутенко, 1964, 1975). Такого рода удобные модели позволяют изучать процессы метаболизма, исключая влияние других тканей и всего организма, исключая влияние вездесущей микрофлоры, и представляют собой в принципе достаточно однородный материал, который можно культивировать в строго контролируемых, заданных условиях. Все это справедливо и в отношении культур тканей макрофитных водорослей.

Каллусные культуры макрофитных водорослей могут быть использованы далее в различных направлениях. В случае, если они получены от агарофитов, можно непосредственно получать из них агар. Так, в японском патенте (Накамура, 1974) — одной из первых работ этого направления — выращивали каллус красных водорослей (гелидиум, грацилярия и др.), из которого затем получали высококачественный агар. Подчеркивалось при этом, что урожай этих водорослей, являющихся источником агара, в морях, омывающих Японию, сильно колеблется по годам и зависит от различных факторов. Для получения каллуса эксплантаты водорослей инкубировали на двух твердых питательных средах на основе морской воды, в состав которых входили соли, источники углерода, соединения, стимулирующие рост, и природные компоненты. Этот патент можно считать примером прикладной направленности работы по получению культур тканей макрофитных водорослей.

Каллусные культуры пищевых макрофитных водорослей, например ламинариевых, могут в перспективе использоваться для получения белка, непосредственно идущего

в пищу и в пищевые добавки, а также в корма сельскохозяйственным животным.

Каллусные культуры возможно также перевести в суспензионные, скорость роста которых, как правило, выше. Для этого применяют интенсивное встряхивание на качалках, мацерирующие ферменты, раздавливание и т. д. При этом как в культурах тканей, так и в клетках будет проявляться свойство тотипотентности, заключающееся в способности к реализации наследственной информации, содержащейся в клетке, в зависимости от конкретных условий, определяемых внешними и внутренними факторами, и вплоть до образования целого растения (Бутенко, 1964). При получении растений из изолированных клеток, тканей или протопластов в экспериментальных условиях происходит именно проявление тотипотентности соматических клеток (как и омнипотентности ядра).

Суспензионные культуры макрофитных водорослей открывают в перспективе возможности использования их в качестве трофического звена в марикультуре. Они могли бы также выступать в качестве партнера в искусственно создаваемых растительных ассоциациях, участники которых обладают полезными свойствами. Выделяемые клетками культуры экзометаболиты, характерные для исходного вида водоросли, будут составлять основу трофического обмена при удачном подборе партнеров в растительной ассоциации или комплексе марикультуры. Необходимо отметить, что при отсутствии токсического и антагонистического действия выделяемых соединений в естественных условиях существуют разнообразные и многочисленные природные ассоциации, например повсеместно встречающиеся комплексы водорослей и бактерий.

Последнее время стали известны искусственные ассоциации, созданные из культуры тканей высших растений и цианобактерий, которые перспективны тем, что один из партнеров (цианобактерии) осуществляет при этом азотфиксацию и выделяемые экзометаболиты утилизируются, по-видимому, клетками партнера (Корженевская, Бутенко, Гусев, 1984, 1986).

Подводя некоторый итог этим рассуждениям, отметим, что в отношении высших растений было ясно показано, что «превращение специализированной клетки растения в каллусную связано с индукцией клеточного деления, способность к которому клетка потеряла в процессе дифференцировки... Каллусная клетка может уподобиться

зиготе и дать начало соматическому зародышу, превращающемуся затем в целое растение, способное цвести и дать потомство» (Бутенко, 1975). Повторим, что в принципе так же обстоит дело и у макрофитных водорослей.

В настоящее время, однако, имеется очень небольшое количество работ, посвященных выращиванию макрофитных водорослей на искусственных питательных средах. Эти работы распадаются в основном на два направления. Первое из них — индукция и выращивание на питательных средах каллусных тканей водорослей, второе — выращивание аксеничных культур, вегетативный рост и регенерация макрофитных водорослей тоже на искусственных средах.

Первое направление началось японским патентом, о котором мы говорили и где подчеркивалось, что до сих пор были известны только способы получения агара непосредственно из добываемых водорослей, а эта работа является способом получения агара из материала (каллуса), наращиваемого из водорослей в лабораторных условиях.

К началу этого направления относится также одна из работ шведской исследовательницы Л. Фриез, выпустившей до этого и впоследствии ряд работ, относящихся скорее ко второму направлению и посвященных выращиванию аксеничных культур макрофитных водорослей. Мы еще будем говорить об этих работах Фриез, однако ее работу 1980 г. можно отнести к первому направлению.

В этой работе Фриез изучала аксеничные культуры из тканей бурых водорослей *Laminaria digitata* и *Laminaria hyperborea*. Материал собирали у побережья Швеции весной или в конце лета — начале осени. Для получения культуры ткани вырезали кусочки размером 5×5 мм из меристематической базальной зоны таллома, стерилизовали их насыщенным раствором гипохлорита кальция, помещали на среду AsP6—F2 и инкубировали при периодическом освещении и температуре 11 °С. Примерно через 6 недель инкубации около 20 % эксплантатов давали бесцветную каллусообразную ткань. Часть этой ткани помещали в дальнейшем в жидкую среду, а часть продолжали пассировать на твердой среде.

Образовывали каллус лучше образцы, собранные в конце лета, когда таллом ламинарии насыщен запасными питательными веществами. Для того чтобы удалить некоторые ингибирующие рост вещества из агаризованной среды, в работе использовалась обработка активирован-

ным углем, а применение гормонов давало образование желто-коричневой ткани.

В вышедшей через два года статье японских исследователей (Сага, Мотомура, Сакаи, 1982) получили индукцию каллуса из морских водорослей. В опытах использовался аксеничный микроталлом *Dictyosiphon foeniculaceus*, который культивировали на среде Провазоли с добавлением 3 % маннита, 0,1 % дрожжевого экстракта и 1,5 % агара. Отдельные агрегаты микроталлома помещали в жидкую и на твердую среду при 14 °С и периодическом освещении, образование каллуса контролировали морфологическими и количественными измерениями. В работе было изучено влияние на образование каллуса ряда углеводов в концентрации 0,0001—1 % и гормонов в концентрации 0,01—100 мг/л. В результате была отработана наиболее благоприятная среда ASP-C-1, на которой каллусная масса через два месяца достигала размера около 1 см. Дальнейшая работа, как считают авторы, должна быть направлена на улучшение среды, индуцирующей редифференциацию каллуса и распространение этой методики на другие виды бурых водорослей.

В том же году вышла работа канадского исследователя Л. Чена, где каллусоподобные образования были получены у красной водоросли *Chondrus crispus* на среде ТС-5, которые при комнатной температуре росли в течение 6 месяцев.

В последнее время интерес к культурам тканей водорослей возрос. К немногочисленным работам первого направления прибавились те, которые были доложены на XI Международном симпозиуме по морской альгологии, состоявшемся в июне 1983 г. в Циндао, КНР. Так, в докладе М. Полна с соавторами говорилось о получении изолированных клеток красной водоросли *Porphyra perforata*, которые культивировались на питательной среде и давали как формирование молодых талломов, так и каллусоподобную массу. Из этой массы с помощью ферментов и механического разрушения получали суспензию клеток. Клетки суспензии снова помещали на твердую питательную среду, и через 1,5 месяца из них развивались типичные проростки водорослей. Авторы считают, что можно, таким образом, в виде каллуса сохранять как бы посевной материал, из которого при необходимости можно получать проростки водорослей.

В докладе на том же симпозиуме сообщалось о полу-

чении каллуса из эксплантатов таллома бурых водорослей *Laminaria japonica* и *Undaria pinnatifida*, который затем при инкубации на твердой питательной среде давал спорофит. Автор сообщает, что полученный каллус также и в условиях моря мог развиваться в зрелые особи.

К первому направлению также относятся наши работы, начатые в МГУ в 1982 г., опубликованные в 1984 г. и являющиеся первыми работами по культуре тканей макрофитных водорослей в нашей стране (Тамбиев, Асланян, 1984; Гусев, Тамбиев, Кирикова, Асланян, Шелястина; 1984, Tambiev et al. 1984). В задачу работы входило изучение возможностей получения каллусных и в перспективе суспензионных культур в первую очередь от агароносных видов водорослей, а также видов, представляющих ценность в пищевом отношении и являющихся продуцентами полезных соединений. Некоторые из использованных нами видов уже показали, согласно литературе, возможность быть моделью для получения аксеничных, каллусных и клеточных культур.

В общей сложности в наших работах использовалось 23 вида красных, бурых и зеленых макрофитных водорослей из бассейнов Черного, Белого, Балтийского и Японского морей.

Работа с культурами тканей макрофитных водорослей ограничена двумя основными трудностями: отсутствием подходящих питательных сред, которые обеспечили бы образование и стабильный рост каллусных и суспензионных культур, и эффективных способов стерилизации, которые должны быть, с одной стороны, достаточно мягкими, чтобы не травмировать ткани эксплантатов водорослей, а с другой — весьма действенными, чтобы обеспечить их аксеничность и освободить от многочисленных присутствующих гидробионтов.

В нашей первой работе стерилизацию эксплантатов водорослей проводили в растворе хлорной извести (Тамбиев, Асланян, 1984). При инкубации в дальнейшем на среде считали, что бактериальное загрязнение отсутствует, если через несколько дней при микроскопировании чашек не обнаруживалось присутствия инфекции.

В естественных условиях, однако, водоросли загрязнены не только бактериями, а и многими сопутствующими организмами — одноклеточными водорослями, морскими грибами, гидроидными полипами и т. д. Они глубоко внедрены в поверхностную слизь, а иногда в случае рыхлого

таллома проникают даже внутрь его. Избавиться от них, как отмечалось рядом авторов, весьма трудно, часто нужна повторная стерилизация. При этом следует помнить, что высокие дозы стерилента могут губительно подействовать на ткани эксплантата, а малые дозы вследствие сказанного неэффективны против сопутствующих гидробионтов. Так, при работе с эксплантатами *Fucus vesiculosus* только через 20—25 дней становилось видно загрязнение диатомовыми водорослями, находившимися в криптостомах таллома, плотно закрытых слизью. За время инкубации на среде диатомовые, видимо, размножались в своих удобных «нишах» жизнеспособных эксплантатов, затем выходили наружу и распространялись по поверхности среды.

Примерно через такие же сроки инкубации эксплантатов *Fucus vesiculosus* начинало проявляться загрязнение гидроидными полипами — нами, например, наблюдался рост и развитие полипа *Obelia longissima* непосредственно на эксплантате. Не сразу появлялись на среде и эксплантатах также нити мицеллия морских грибов.

Все это заставило провести достаточно трудоемкую работу по подбору стерилентов, сравнению их эффективности и режимам стерилизации (Гусев, Тамбиев, Кирикова, Асланян, Шелястина, 1984).

Сравнивали известный по ряду работ стерилент гипохлорит кальция и хлоргексидинбиглюконат (ХГ), ранее примененный в одной из работ с высшими растениями. Опыты показали большую эффективность ХГ при инкубации эксплантатов при различных температурах, при этом более высокая способствовала выявлению инфекции. Концентрация стерилента и время обработки подбирались в зависимости от таллома водоросли — для более нежного и тонкого таллома достаточна была обработка 2%-ным раствором в течение 10 мин, в то время как для складчатых и более жестких или, наоборот, водянистых и рыхлых таллобов следовало увеличивать концентрацию и время обработки.

В итоге была отработана схема получения аксеничных эксплантатов из таллобов морских водорослей, включающая ряд последовательных операций. Хотя основные загрязнения проявляются в первые 10—12 суток, окончательную эффективность стерилизации можно увидеть лишь после 30 суток инкубации. Эксплантаты, не выявившие инфекции за этот срок, можно в дальнейшем считать аксеничными. Нам удавалось поддерживать эксплантаты

в аксеничном и жизнеспособном состоянии при неоднократном пассировании в течение 30 месяцев.

Для работы в общей сложности использовалось 14 питательных сред, часть из которых известна из литературы, а часть (9 сред) являлась оригинальной. В результате работы было показано, что аксеничные эксплантаты водорослей, инкубированные на твердых питательных средах, образуют на поверхности среза каллусные структуры, которые были получены у 11 видов водорослей (у 9 видов — впервые в литературе), в том числе у 8 видов агарофитов — *Phyllophora nervosa*, *Gracilaria verrucosa*, *Furcellaria fastigiata*, *Ahnfeltia tobuchiensis*, *Gelidium vagum*, *Laurencia paniculata*, *Ceramium kondoi*, *Rhodomenia per-tusa*.

У черноморской агарофитной водоросли *Phyllophora nervosa* был получен пересадочный каллус, который в процессе роста неоднократно пассировался на свежую питательную среду.

Частота каллусообразования в зависимости от вида водоросли составляла от 2—4 до 15—18 %, что совпадает или несколько выше известных данных. Образование каллусных структур происходило лучше всего при периодическом освещении в 1200—1500 лк и температуре 12—18 °С.

Мы наблюдали образование каллусных структур двух типов, первый из которых представлял собой неровную бугристую структуру, образованную корковой тканью из плотно прилегающих друг к другу мелких, интенсивно окрашенных в желто-бурый цвет клеток размером 0,05—0,1 мм. Прирост структуры составлял несколько миллиметров за два месяца. Второй тип — слабоокрашенные или бесцветные каллусные структуры, образованные в основном медуллярной тканью, из хрупких клеток округлой формы размером 0,1—0,5 мм. Наряду с этими клетками по линии среза эксплантата образовывались крупные угловатые клетки размером до 1,5 мм. Скорость роста структур второго типа была несколько большей и составляла 2—3 мм в месяц. Одни и те же виды водорослей могли образовывать каллусные структуры обоих типов, соотношение которых зависело от присутствия в среде гормонов. Так, например, присутствие кинетина способствовало образованию структур второго типа.

Описанными работами в основном исчерпывается первое направление по получению культур тканей макрофит-

ных водорослей. Второе направление, касающееся выращивания аксеничных культур и проростков водорослей и их вегетативного роста на искусственных питательных средах, начиналось работами уже известной Л. Фриез (1963, 1970) и канадских исследователей Л. Друеля и С. Чиао (1969).

В работе 1963 г. Фриез подробно описала получение аксеничных культур 6 видов красных водорослей из морей, омывающих Швецию. Кусочки таллома водорослей, взятых из моря, обрабатывались антибиотиками и инкубировались на питательных средах при различном освещении, оптимум интенсивности различался у разных видов. Детально исследовалось влияние на рост культур различных источников углерода, азота, фосфора, ионов металлов; был отработан состав среды ASP6F, использовавшейся в дальнейших работах. Работа была кропотливой и длительной — водоросли в аксеничной культуре постепенно теряли жизнеспособность и часто подвергались вторичному инфицированию, аксеничные растения получались из многих сотен эксплантатов и росли очень медленно. Подобные трудности характерны для всех работ по культурам тканей водорослей.

Развивая это направление, плодотворно работающая Фриез выпустила в последующие годы серию работ. Далее (1970) она исследовала влияние на рост аксеничных культур микродобавок органических веществ невитаминного происхождения. Отмечалось, что культуры постепенно теряют свою жизнеспособность, но восстанавливают ее, если случайно заражаются определенными бактериями, дрожжами или грибами, которые, по-видимому, выделяют вещества (экзометаболиты), необходимые водорослям для нормальной жизнедеятельности.

В дальнейшей работе (Фриез, 1977) было показано благоприятное действие фенилуксусной и гидрофенилуксусной кислот на рост аксеничной культуры *Fucus spiralis* на питательной среде. Инфицированный бактериями таллом рос быстрее, вероятно, по причине, отмеченной в предыдущей работе.

В 1982 г. появились две работы Фриез по влиянию селена и ванадия на аксеничные культуры морских водорослей. Благоприятное действие селена, видимо, связано с тем, что он в определенных количествах аккумулируется красными и бурыми водорослями и в отдельных звеньях

метаболизма может заменять серу. Сходное положительное действие на культуры отмечалось у ванадия.

На симпозиуме 1983 г. в Циндао Фриез выступила с докладом по индукции проростков в аксеничной культуре ризоидов *Fucus spiralis*. Отдельные ризоиды стерилизовались и выращивались сначала в жидкой, затем на твердой среде ASP6F2. Вначале развивались пучки разветвленных желто-коричневых нитей, которые на твердой среде формировали плотную ткань.

Немного позже первых работ Фриез появилась работа Друеля и Чиао (1969) по получению аксеничных культур ламинариевых водорослей. В качестве стерилента авторы брали смесь антибиотиков, от спорифита водорослей отрезались сорусы и помещались в среду ASP2M. Освободившиеся мейоспоры прорастали в жидкой среде в гаметофиты, указывалось при этом, что аксеничные условия не способствуют образованию спорифита.

Аксеничные гаметофиты ламинариевых — гигантской практически важной водоросли *Macrocystis angusti* — также получили в недавней работе Зарму и Гибор (1983). Кусочки таллома очищались ультразвуком и антибиотиками, из них получали мейоспоры, которые при регулярном пассировании развивались на твердой питательной среде в гаметофиты.

Канадские исследователи Чен Л. и Тейлор А. (1978) получили из медуллярной ткани гаметофита полезной водоросли *Chondrus crispus* аксеничную культуру. Авторы подчеркивали важность и необходимость разработки методов получения культур тканей макрофитных водорослей. Для неоднократной стерилизации применялись антибиотики. Из медуллярной ткани вырезали кубик со стороной 2 мм и инкубировали в жидкой среде на качалке. Около 10 % эксплантатов через 3 месяца образовывали апексы, которые впоследствии превращались в дихотомически ветвящиеся проростки. Авторы считают, что используемый ими метод должен стать необходимым при работе с аксеничными культурами красных водорослей.

Позднее Чен (симпозиум 1983 г. в Циндао) сообщил о влиянии кинетина на регенерацию и рост сегментов таллома на среде у той же водоросли.

Там же американский автор Ли Т. сообщил о получении роста эксплантатов *Laminaria saccharina* и *Laminaria digitata* на срезанной поверхности, в результате чего возникали спайковые нитевидные образования. Тогда же

было сообщение китайских авторов об изоляции и культивировании на питательной среде вегетативных клеток агароносной водоросли *Gracilaria verrucosa*, что приводило через 4—5 дней к слиянию около трети клеток в агрегат с общей стенкой. Фанг Т. сообщил в своих тезисах о получении из изолированных клеток и культур тканей водорослей клонов с разным генотипом.

Полученные нами данные также свидетельствуют о возможности вегетативного роста аксеничных эксплантатов на питательных средах — мы наблюдали это почти у всех исследованных видов водорослей. Так, при инкубации на твердой среде эксплантатов красной водоросли *Rhodimenia palmata* мы наблюдали образование выростов сначала в виде слизистых бугорков, лишенных пигментации. Из них через 25—30 дней начали формироваться цилиндрические проростки, которые росли и постепенно дифференцировались. В возрасте 4,5—5 месяцев проростки достигали размера 5—8 мм, и у них уже четко различались зоны ризоидов, стволика и листа.

На твердой среде эксплантаты красной водоросли *Grateloupia dichotoma* в течение 30—40 дней образовывали многочисленные пролификации (выросты), пигментация которых к концу срока практически не отличалась от основного таллома. После 1,5—2-месячного срока эксплантаты красной водоросли *Phyllophora peruvosa* давали ответвления таллома, достигавшие к концу 3-го месяца инкубации длины 5—6 мм. При инкубации эксплантатов водоросли *Laurencia obtusa* начинающие развиваться проростки за 35—40 дней достигали длины 4—6 мм, при этом их структура и пигментация соответствовали основному таллому. Примерно за такой же срок развивались из эксплантатов *Gracilaria verrucosa* молодые проростки до размеров 8—10 мм, пигментация их также усиливалась по мере роста.

На более поздних стадиях за некоторыми исключениями происходило снижение темпов роста и дифференциации проростков. Видимо, по мере вегетативного роста составы сред и условия инкубации должны постоянно корректироваться. Мы не выращивали водоросли из одной клетки, как делали некоторые авторы, однако наблюдали при инкубации эксплантатов *Fucus vesiculosus* на твердой питательной среде выход оогониев и яйцеклеток (Тамбиев, Асланян, 1984).

Подводя итог, можно сказать, что получение культур

тканей макрофитных водорослей — каллусных, суспензионных, выращивание аксеничных культур и вегетативный рост на искусственных питательных средах, несмотря на немногочисленность существующих пока работ, оформилось сейчас в интенсивно развивающееся направление альгологии, которое привлекает все новых исследователей. Это определяется к тому же высокой полезностью видов водорослей, с которыми проводится работа, их практической значимостью в жизни человека.

Литература

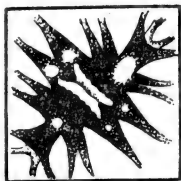
Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений.— М.: Наука, 1964.

Бутенко Р. Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений.— М.: Наука, 1975.

Тамбиев А. Х., Асланян Р. Р. Океанология.— Т. 24, вып. 1.—1984.— С. 139.

Гусев М. В., Тамбиев А. Х., Кирикова Н. Н., Асланян Р. Р., Шелястина Н. Н. // Изв. АН СССР, сер. биол., 1984.— № 5.— С. 716.

Жизнь растений.— Т. 3.— М.: Просвещение, 1977.



Л. В. ГАРИБОВА,
доктор биологических наук

Грибная индустрия сегодняшнего дня

Статистические данные ООН по вопросам продовольствия и сельского хозяйства свидетельствуют о том, что проблема обеспечения населения нашей планеты продуктами питания внушает серьезные опасения. По этим данным, более половины населения Земли не обеспечено достаточным количеством продуктов питания, примерно 500 млн. людей голодают, а около 2 млрд. питаются недостаточно или неправильно.

С 1970 до 1980 г. население Земли выросло еще на 1 млрд. человек, а к концу 1985 г. составило 4,8 млрд. человек, причем в развивающихся регионах проживает сейчас 3,6 млрд. человек и прирост населения здесь превышает 2 %, а в странах Африки — 3 %.

Предполагается, что к концу XX в. население нашей планеты с учетом контроля рождаемости составит 6 млрд. человек. Следовательно, тяжелое уже сейчас положение с продуктами питания может принять в недалеком будущем для некоторых народов угрожающие масштабы. Ведь для того, чтобы поддерживать удовлетворительный уровень питания к 2000 г., мировое производство продовольствия необходимо увеличить в 4—5 раз, а продуктов животноводства — в 9 раз.

Взрослому человеку при выполнении легкой физической работы достаточно 3000 кал в сутки, которые содержатся в 750 г сахара. Но удовлетворить потребности организма только за счет сахара практически невозможно, так как пища доставляет человеку не только энергию для работы, но и материал для роста и обновления клеток и тканей. Поэтому пища должна быть разнообразной и содержать белки, жиры, углеводы и витамины. Источники энергии — жиры и углеводы в определенных пределах взаимозаменяемы, причем их можно заменить и белками, но белки нельзя заменить ничем. Проблема питания людей в конечном счете заключается в дефиците белка. Там, где сегодня люди голодают, не хватает прежде всего белка...

Установлено, что ежегодный дефицит белка в мире,

по самым скромным подсчетам, оценивается в 15 млн. т. Для того чтобы наладить соответствие между производством продуктов питания и ростом населения Земли, необходимо уже сейчас принимать серьезные меры. Улучшить положение дел с продовольствием в настоящее время и попытаться решить будущие проблемы можно, только используя все имеющиеся современные средства и изыскав новые источники получения продуктов питания, среди которых наряду с дарами морей и океанов важное место должны занять гетеротрофные организмы — грибы.

Подсчитано, что с количественной стороны, т. е. по выходу белка на единицу земельных угодий, грибы как сельскохозяйственная культура во много раз превосходят производство говядины и рыбоводство и на земной поверхности не имеют себе конкурентов. Здесь уместно напомнить о таком явлении, как необычайно быстрый по сравнению с другими организмами рост плодовых тел грибов («растут как грибы») и их грибницы, которую называют еще и термином «мицелий», т. е. быстрое накопление их биомассы. Расшифровка этого процесса еще далеко не завершена. Однако использовать эту особенность грибов мы можем уже сейчас.

Примерная оценка выхода говядины при ее производстве современными методами составляет в среднем 63,5 кг сухого белка на 1 га в год. Рыбоводство, являющееся относительно новым, развивающимся методом производства белка, может дать 567,5 кг сухого белка с 1 га в год. А многие грибоводческие предприятия уже в настоящее время получают 67 000—78 000 кг сухого белка с 1 га обрабатываемой поверхности в год. Иными словами, урожай грибов с 1 га может достигать уже сейчас 11 000 ц в год по сравнению с 70 ц зерновых культур или 500 ц овощных. При этом производство грибов может осуществляться круглогодично, независимо от погодных и почвенных условий, а при современной технологии, которая еще далеко не совершенна, в год в шампиньоннице делается 5—6 оборотов при урожае 15—20 кг с 1 м² поверхности, которая может быть и многоярусной.

Не здесь ли таятся новые источники белка для увеличения производства продовольствия в связи с ростом мирового населения? К этому необходимо добавить, что число потребителей грибных продуктов постоянно увеличивается, поскольку грибы обладают высоким содержанием белков, витаминов, экстрактивных и минеральных

веществ, отличными вкусовыми качествами и в комплексе отвечают современным требованиям калорийности и содержания питания.

Питательная ценность грибов находится на уровне между питательной ценностью мяса и овощей, во всяком случае она такая же, как питательная ценность самых хороших овощей, поэтому грибы особенно годятся для добавления к бедной белком растительной пище, например из картофеля и хлебных злаков. Грибы значительно улучшают вкусовые качества этой пищи.

В то же время содержание калорий у грибов невысокое. Так, 100 г свежих грибов содержат только 30—50 ккал в зависимости от вида. Таким образом, грибная пища отлично подходит малоподвижным и занимающимся умственной деятельностью людям.

Однако это лишь один аспект использования грибов. Большой проблемой во всем мире и у нас является корм для скота, так как для получения жизненно необходимого животного белка, содержащего аминокислоты — структурные элементы белка человека, нужно скармливать огромное количество растительного сырья. Значительный вклад в решение проблемы кормов можно было бы внести, используя «кормовые грибы», которые очень полезны для скота и особенно для разводимой рыбы. Многолетние опыты показали, что при содержании скота на пастбищах и кормлении в стойлах грибы являются дополнительным ценным кормом, причем можно применять как плодовые тела, так и растительный субстрат, проросший мицелием, т. е. обогащенный грибным белком. Установлено, что для скармливания скоту можно применять практически все виды съедобных грибов и их отходы (ножки).

Эти обстоятельства и побудили многие страны, даже с высокоразвитым сельским хозяйством, к созданию национальных программ по изучению возможностей производства грибов. И за последние годы грибная промышленность сделала значительный шаг вперед.

Сейчас искусственно выращивают съедобные грибы около 70 стран, и мировое производство грибной продукции выросло с 60 тыс. т в 1950 г. до 900 тыс. т в 1980 г., а в настоящее время мировое производство грибов превысило 1,2 млн. т и имеет тенденцию к интенсивному росту. Все это стало возможным благодаря методам селекции высокопродуктивных сортов, разработке новых технологий культивирования, замене традиционных субстратов различ-

ными отходами сельского хозяйства и промышленности, а также развитию механизации процессов культивирования. Значительный прогресс наблюдается и в области разработки способов глубинного выращивания в специальных ферментерах мицелия съедобных грибов как источников биомассы и биологически активных веществ (ферментов, витаминов и т. д.). Главными производителями грибов являются США, Франция, Япония, ФРГ, ВНР и др., где создана грибная индустрия. Кстати заметим, что это страны, где сбор дикорастущих грибов не является традиционным, как у нас, и почти не ведется.

Среднегодовое потребление искусственно выращенных грибов в экономически развитых странах составляет сейчас 2,2 кг на человека в год и в промышленном производстве находится около 7—10 видов грибов: шампиньон двуспоровый, сиитаке, вольвариелла, вешенка обыкновенная или устричная, опенок зимний, черный трюфель и некоторые другие.

Себестоимость производства 1 кг культивируемых грибов в переводе на рубли по курсу колеблется в отдельных странах от 40 до 90 коп. Однако грибная индустрия еще не заняла в сельском хозяйстве то место, которое она по праву должна занимать как у нас в стране в связи с решением Продовольственной программы СССР, так и за рубежом в связи с общими проблемами питания.

Во всем мире перед людьми сейчас стоят две очень важные проблемы. На одной из них — увеличении производства продуктов питания на душу населения — мы уже остановились. Вторая, не менее важная, проблема, связанная с охраной окружающей среды, — это проблема удаления отходов как производства, так и потребления. Поскольку на отходах сельскохозяйственного, пищевого и лесоперерабатывающего производства можно выращивать культивируемые съедобные грибы, то грибная промышленность способна решать одновременно обе эти задачи — увеличить количество продуктов питания и утилизировать отходы.

Люди употребляют грибы в пищу с глубокой древности. Поэтому сделать грибы такой же управляемой сельскохозяйственной культурой, как зерновые злаки, овощи, фрукты, давно уже стало актуальной задачей. Однако решить ее оказалось намного сложнее, чем это можно было предположить вначале.

Наиболее легко поддаются искусственному выращи-

ванию древоразрушающие грибы. Это связано с особенностями их биологии, которые стали нам известны и понятны только сейчас. Их способность легко расти и плодоносить использовали с древнейших времен. Искусственное разведение древоразрушающих грибов получило довольно широкое распространение преимущественно в странах Дальнего Востока и Юго-Восточной Азии, причем насчитывает оно свыше 2000 лет, а технологические секреты культуры передаются грибоводами из поколения в поколение.

До нас дошли сведения о том, что древние греки владели познаниями в технологии выращивания некоторых древоразрушающих грибов, однако промысел этот широкого развития не получил и потомки их скоро его забыли.

Наиболее распространенной культурой на Востоке стал древоразрушающий гриб, называемый сиитаке или лентинус эдодес, встречающийся в естественных условиях в Китае, Японии, Малайзии и на Филиппинах на дубе, грабе и буке. Сиитаке и до сих пор искусственно выращивается в Японии, в Южной Корее, в Китае и на о. Тайвань, причем масштабы его производства увеличиваются с каждым годом.

Уже более 10 лет грибы сиитаке являются одним из важнейших сельскохозяйственных экспортных продуктов Японии. Их в сушеном виде отправляют во Францию, ФРГ, США и Англию, то есть в страны с несравненно большими экспортными возможностями сельского хозяйства.

Из культивируемых грибов сиитаке сейчас — пожалуй, самая старая культура. В связи с успешной разработкой метода выращивания сиитаке в закрытых помещениях на опилках с различными добавками и на рисовой соломе, смоченной экстрактом из соевых бобов, культивирование этих грибов существенно упростилось, перестало зависеть от погодных условий. Выращивать этот гриб сейчас пробуют в ФРГ, Италии, Австрии и других странах. Этот способ называется интенсивным в отличие от экстенсивного, когда грибы выращивают непосредственно на отрезках древесины.

Сиитаке развивается и образует плодовые тела на древесине лиственных пород деревьев. Для его развития необходима температура 12—20 °C и воздух с высокой влажностью, что технологически при современных методах грибоводства большого труда и особых затрат не тре-

бует. При классическом способе выращивания на древесине плантации сиитаке устраивают на открытом воздухе в затененных местах. В последнее время очень хорошие результаты получаются при выращивании этого гриба в теплицах и других помещениях, что делает их производство хотя и более дорогим, однако менее зависимым от погодных условий, что является важным фактором, обеспечивающим стабильный урожай грибов.

Как мы уже сказали, сиитаке разводят на древесине специально поваленных лиственных пород, распиливая для этого деревья на отдельные бруски, которые заражают мицелием сиитаке. Бруски устанавливают наклонно, и в таком положении древесина зарастает грибницей. Первые плодовые тела сиитаке появляются на древесине через 2 года при наличии дождей или искусственного орошения. Общая продолжительность сбора грибов — 6 лет, причем с 1 м³ древесины за это время снимают около 240 кг сырых грибов. В конце 70-х годов выращиванием сиитаке в Японии было занято 188 тыс. человек, которые производили продукцию на сумму 1,1 млрд. долларов в год. По мировому валовому сбору (130 тыс. т в год) сиитаке уступает только культивируемому шампиньону, мировое производство которого составляет около 800 тыс. т в год. Таким образом, в грибной индустрии Японии сиитаке занимает ведущее место и в то же время выходит на мировую арену.

Недавно в Японии был запатентован новый способ выращивания сиитаке, согласно которому проводят стимулирование плодоношения гриба путем вымачивания в течение одного-двух дней в холодной воде отрезков древесины после годовичного их зарастания мицелием. Вымоченные отрезки помещают в парники или теплицы с температурой воздуха 15—20 °С и с высокой влажностью воздуха. Через 7—10 дней начинается плодоношение, а через неделю после сбора урожая отрезки снова опускают в воду и процесс повторяется. В среднем за год таким способом получают четыре-пять урожаев, а один отрезок древесины выдерживает до 15 циклов, прежде чем древесина будет окончательно разложена грибом и превратится в труху. Способ этот ценен еще и тем, что позволяет выращивать грибы в течение целого года. Но, несомненно, в перспективе — разведение этого гриба, ценного как в пищевом отношении, так и перспективного с точки зрения фармакологии для получения некоторых лекарственных препаратов, на опилках, соломе и других отходах в регу-

лируемых условиях специализированных помещений, с автоматически поддерживаемым режимом.

Однако искусственное разведение грибов имеет естественное препятствие, преодолеть которое смогут только микологи будущего, вооруженные более высоким уровнем знания физиологии и генетики грибов, особенностей их развития. Все дело в том, что наиболее ценные съедобные грибы, такие, как белый, подберезовик, цезарский гриб, подосиновик и др., искусственное разведение которых представляло бы наибольший интерес, относятся к группе микоризных грибов, и их культура в искусственных условиях без наличия соответствующих пород деревьев до последнего времени не представлялась возможной. В России предпринимались попытки разводить различные лесные деликатесные грибы, такие, как рыжики, подберезовики и белые, но они не имели производственного значения и не получили сколько-нибудь широкого распространения и теоретического обоснования. Способ разведения этих грибов был весьма примитивен и заключался в том, что на садовый участок, засаженный соответствующими породами деревьев — елью, березой и т. д., — переносили дикорастущую грибницу или это место поливали настоем, приготавливаемым из созревших плодовых тел. В некоторых местах таким способом действительно удавалось выращивать микоризные грибы, но все это имело значение лишь для грибоводов-любителей.

Ряд работ последних лет показал, что в искусственных условиях при отсутствии корней деревьев можно получать плодовые тела микоризных грибов. И хотя до промышленного производства этих грибов еще далеко, освоение метода и культивирование в лабораторных условиях открывает возможности для дальнейшего изучения их биологии, что, безусловно, является решающей предпосылкой для их широкого культивирования в будущем. Эти работы связаны с расшифровкой механизмов плодообразования у грибов. Результаты этих исследований показали, что образование плодовых тел у грибов в значительной степени связано с тем, на каком субстрате они растут, т. е. с принадлежностью грибов к той или иной экологической группе. Одни грибы, преимущественно растущие на древесине (так называемые ксилотрофы) или на лиственном или хвойном опаде, образуют плодовые тела в стерильных условиях, и получить у них плодообразование в искусственных условиях довольно легко. Другие, рас-

тушие на перегнойной почве, такие, как шампиньон двуспоровый, требуют для образования плодовых тел обязательного присутствия почвенных бактерий и микроскопических грибов. Третьим, микоризным, грибам необходима для этого связь с корнями древесных пород. Но не исключено, что для многих из них также нужно присутствие почвенных микроорганизмов.

Все это выявлено лишь в последние 10 лет, когда интенсивно стали развиваться такие разделы биологии, как биоценология и экология, и нашло свое отражение в микологии — науке о грибах. Было обращено внимание на то, что мицелий грибов развивается в почве, где вступает в сложные взаимоотношения с множеством микроорганизмов, ее населяющих. Там же на мицелии закладываются и плодовые тела грибов. И именно характер этих взаимоотношений оказался решающим для образования плодовых тел ряда шляпочных грибов. Механизм этих взаимоотношений и, следовательно, самого процесса плодобразования еще до конца не расшифрован. Но подходы к нему определены, и исследования в этом направлении ведутся во многих лабораториях мира. Они станут основой, теоретической предпосылкой для введения в культуру новых видов грибов, в том числе и самых ценных — микоризных.

А пока из всей этой группы микоризных грибов только культура черного или французского трюфеля получила более или менее широкое распространение еще с середины XVIII в. во Франции. Черный трюфель имеет сильный и стойкий аромат и нежный вкус. Сейчас французский трюфель считается одним из самых деликатесных блюд и высоко ценится на мировом рынке. Главным производителем черного трюфеля является Франция, где ежегодно производят 100—200 т этого гриба. В отдельные годы его урожай достигает 800 т. Сейчас выращивают трюфель и в Северной Италии.

Для культивирования черного трюфеля, как и 200 лет назад, используют естественно растущие и искусственно насаженные дубовые и буковые рощи. В настоящее время производство трюфелей во Франции пытаются поставить на промышленную основу. Имеется фирма, которая снабжает микоризными саженцами хозяйства, производящие этот гриб. Отпадает необходимость в переноске естественной грибницы, вместе с которой ранее заносились возбудители болезней и вредители трюфеля.

Способом, весьма сходным с выращиванием французского трюфеля, разводят в рощах и яблоневых садах сморчковые грибы, в основном сморчок конический.

Уже давно основной сельскохозяйственной культурой среди грибов, бесспорно, стал шампиньон двуспоровый или культивируемый, который в настоящее время выращивают более чем в 70 странах, причем его производство достигает примерно 800 тыс. т. Именно этот гриб и выращивается по-настоящему индустриальным способом, где механизированы все основные производственные процессы и полностью автоматизировано регулирование основных параметров, определяющих оптимальный режим для роста культуры.

Столь широкому распространению шампиньонов способствовали две причины: во-первых, шампиньон, будучи почвенным сапротрофом, не требует для своего развития древесной породы, что необходимо микоризным грибам. Это обстоятельство дает возможность выращивать шампиньоны в теплицах, в выработанных каменоломнях и в специализированных помещениях — шампиньонницах, где, изменяя условия среды — температуру, влажность, состав субстрата, — можно управлять ростом и развитием грибов, улучшая их качество и увеличивая урожайность. Во-вторых, развитию шампиньоноводства способствовала быстрая разработка, получение и широкое применение качественного посадочного материала — стерильной грибницы, которая была впервые получена в 1893—1894 гг. в Пастеровском институте во Франции. Сейчас на выработке зерновой стерильной грибницы как основного посадочного материала при выращивании шампиньонов, специализировалось несколько фирм, накопивших в настоящее время значительный опыт этой работы.

Выращивание грибницы шампиньона, как и грибницы большинства других культивируемых грибов, является специализированным микробиологическим стерильным производством и осуществляется или в специально оборудованных лабораториях, или на заводах, оборудованных современным биотехнологическим оборудованием, и таким образом, что весь многоэтапный процесс выращивания грибницы шампиньона от посева его спор до получения конечного продукта — зерновой стерильной грибницы, готовой к посадке в компостные грядки, — непрерывен и осуществляется в полностью стерильных условиях. Такой завод совмещает в себе черты микробиологической

лаборатории и современного технически оснащенного завода.

У нас в стране в настоящее время при совхозе «Заречье» Московской области пущен современный завод по производству грибницы шампиньона и вешенки устричной. Мощность этого завода — до 500 т грибницы в год, что позволяет ему снабжать стерильной зерновой грибницей, наиболее качественной и высокоурожайной, грибоводческие хозяйства нашей страны и не оставлять без внимания просьбы грибоводов-любителей, число которых у нас постоянно растет.

Здесь необходимо отметить, что в СССР в настоящее время производится всего около 3 тыс. т грибов, причем в основном это шампиньон двуспоровый, который выращивается более чем в 80 хозяйствах, но из них лишь в совхозах «Московский» и «Заречье» под Москвой и в совхозе фирмы «Лето» под Ленинградом уровень производства отвечает современным требованиям.

Организация промышленного крупнотоннажного производства шляпочных грибов является важной народнохозяйственной проблемой, направленной на улучшение питания населения нашей страны. Поэтому в настоящее время в области поверхностного выращивания и глубинного культивирования съедобных шляпочных грибов работает 48 научных, научно-практических и производственных учреждений.

Говоря о культивировании съедобных грибов в нашей стране, следует иметь в виду, что мы обладаем исключительным изобилием дикорастущих грибов, причем на всей территории страны. При этом очень важно, что сбор, обработка, консервация и употребление в пищу дикорастущих грибов является у нас исторически традиционным занятием.

Подсчитано, что если бы у нас собирали хотя бы 5 % дикорастущих съедобных грибов, то мы буквально заваляли бы все рынки мира первосортными грибами! Но пока сбор и переработка дикорастущих грибов в нашей стране имеют много проблем, и увеличение их сбора и консервации продолжает оставаться одной из серьезных задач Центросоюза и других организаций, заготавливающих и перерабатывающих грибы. Впрочем, дикорастущие грибы — иная тема, заслуживающая отдельного рассмотрения.

Сейчас уже просто невозможно установить, когда и где

впервые стали заниматься разведением шампиньонов. Предполагают, что первоначально эта культура возникла в Северной Италии, а оттуда проникла во Францию, где была должным образом оценена и получила широкое распространение. Сведения о ней имеются в руководствах по садоводству и огородничеству, относящихся к середине XVII в. Таким образом, к настоящему времени культивирование шампиньонов насчитывает уже более 300 лет. Применение стерильной грибницы с начала XX столетия резко повысило урожай шампиньонов. И поскольку эта культура стала приносить стабильные доходы, она начала интенсивно развиваться: улучшилось качество грибницы, резко возросла механизация всех процессов производства как грибницы, так и самих грибов, чему, безусловно, способствовало значительное повышение спроса на грибы на мировом рынке и исключительно благоприятные перспективы на будущее. В настоящее время объем мировой продукции шампиньонов настолько увеличился, что шампиньоноводство выделилось в самостоятельную, очень сложную и технически оснащенную специализированную отрасль сельского хозяйства. Сейчас во Франции, в Англии, США, Голландии, ФРГ, а также в некоторых социалистических странах, например в ВНР, создана целая грибная индустрия, включающая не только выращивание, но и многообразную переработку и консервирование грибов, в частности шампиньонов.

Старая технология выращивания шампиньонов обеспечивала урожай от 5 до 9 кг с 1 м² шампиньонной грядки или стеллажа. В год удавалось сделать всего два оборота, и таким образом, годовой урожай с 1 м² составлял еще в 50-е годы максимально 18 кг. По новой технологии с 1 м² полезной площади шампиньонницы устойчиво получают в год до 400 кг грибов. Следовательно, за 50 лет урожайность шампиньонов с 1 м² посадки увеличилась в 22 раза. Какая еще сельскохозяйственная культура может похвастаться таким приростом урожайности и такой урожайностью вообще?

Но возможности интенсификации этой культуры еще не исчерпаны полностью. Еще не сказали своего слова селекция и ее теоретическая основа — генетика шампиньона. Хотя селекция этого гриба ведется давно, но успехи ее по сравнению с совершенствованием технологии выращивания еще скромны. Шампиньон — гриб обоеполый. Поэтому получение новых высокоурожайных и устойчивых

к болезням сортов за счет скрещивания — задача сложная. Здесь могут оказаться перспективными такие современные методы селекции, как получение мутантов с помощью различных мутагенных факторов или метод слияния протопластов.

Наконец, интересно отметить, что культивируемый повсеместно шампиньон двуспоровый в природе встречается чрезвычайно редко и его не следует смешивать с шампиньоном обыкновенным или полевым, который довольно широко распространен, однако по целому ряду причин менее пригоден к искусственному выращиванию, чем двуспоровый.

Из других почвенных сапротрофов, выращиваемых промышленным способом в значительных масштабах, прежде всего следует назвать вольвариеллу съедобную, которую часто называют «травяным шампиньоном», хотя она сродни мухоморам и грибу-поплавку, а к шампиньонам никакого отношения не имеет. В Японии, Китае, Индонезии, Бирме и Таиланде вольвариеллу широко культивируют, разводя ее на рисовой соломе, используя в качестве посадочного материала специально приготовленную стерильную грибницу, что, как и в случае с шампиньоном двуспоровым, обеспечивает стабильные и высокие урожаи и является неременным условием промышленного культивирования съедобных грибов. Наиболее благоприятные условия для выращивания вольвариеллы — это сочетание температуры воздуха в пределах $+24^{\circ}\text{C}$ с высокой влажностью около 80 %. Температура в соломенной гряде должна быть от 32 до 40°C , что соответствует тропическим и субтропическим районам, где культура ведется на открытом воздухе, что делает продукцию сравнительно дешевой. В зонах с умеренным климатом вольвариеллу выращивают в закрытом грунте, и поскольку это связано с серьезными затратами, культивирование ее здесь распространено меньше. Вольвариелла — нежный по консистенции и вкусу гриб. Собирают его тогда, когда вес плодового тела достигнет 30—50 г. Грибы эти обычно употребляют свежими, и из-за своей нежной структуры они не подлежат транспортировке.

В последнее время стали известны успешные опыты по выращиванию вольвариеллы на среде из перемолотых початков кукурузы. Такие опыты проводятся в Венгрии, Голландии и некоторых других странах Европы, причем в ряде случаев удавалось довести урожай до $160\text{ кг с }1\text{ м}^2$

гряд в год. По имеющимся сведениям, в 1975 г. всего в мире вольвариеллы было выращено около 42 тыс. т, но с тех пор производство ее несколько возросло.

Новым очень ценным и перспективным для выращивания грибом — подстилочным сапротрофом является строфария кольцевая, или кольцевик, как его называют в грибоводческой литературе. Это довольно крупный гриб, диаметр шляпки достигает 20—25 см. Он напоминает по окраске подосиновик, но относится к грибам пластинчатым. В естественных условиях встречается редко и не обильно. Кроме питательной ценности и отличных вкусовых качеств, преимущество этого вида заключается в том, что он легко поддается культивированию, причем для его выращивания используется простой и дешевый субстрат — увлажненная солома, к которой не нужно добавлять никаких удобрений, которые только отрицательно сказываются на развитии грибницы. Проведенные у нас в стране опыты по выращиванию кольцевого гриба показали, что он является довольно урожайным грибом и дает до 16 кг с 1 м² грядки. Учитывая средний урожай вполне испытанной культуры — шампиньона двуспорового, 14—22 кг с 1 м² грядки, — полученные результаты по выращиванию кольцевого гриба являются весьма обнадеживающими. Исключительная устойчивость этого гриба к неблагоприятным условиям, особенно к колебаниям температуры, позволяет выращивать его не только в закрытых помещениях, но и в открытом грунте, что значительно удешевляет его производство.

Технология выращивания кольцевого гриба была разработана в 1969 г. специалистами ГДР, и сейчас его выращивают в Польше, Венгрии, Англии и начинают осваивать в ряде других стран Европы. Многочисленными опытами установлено, что оптимальные условия для выращивания кольцевого гриба могут быть созданы в парниках, где легко обеспечить проветривание, столь необходимое при плодообразовании грибов, и защиту от прямых солнечных лучей. Кроме того, парники предохраняют субстрат, на котором растет гриб, от переувлажнения при дождях и от пересыхания. В парниках также легко поддерживать температуру +28 °С, наиболее благоприятную для развития грибницы кольцевого гриба.

Кольцевик — быстро плодоносящий гриб. От закладки грядок до первого сбора грибов проходит около четырех недель. В отличие от шампиньонов кольцевик собирают

уже полностью созревшим, т. е. тогда, когда пленка, прикрывающая его пластинки, прорвана, но шляпка еще полностью не раскрылась и имеет колоколовидную форму.

Свой рассказ о промышленном выращивании съедобных грибов мы начали с разводимого с древнейших времен древоразрушающего гриба сиитаке. Но и сейчас интерес к разведению древоразрушающих грибов, или ксилотрофов, не уменьшился и число их видов, введенных в культуру, значительно возросло. Это связано с новыми проблемами, возникшими уже в наше время. Одна из них — необходимость рационального и комплексного использования сырьевых ресурсов как одного из условий интенсификации производства и успешного развития народного хозяйства. В связи с этим проблема искусственного выращивания древоразрушающих грибов приобретает в настоящее время все бóльшую актуальность. Комплексный подход к вопросу разведения грибов этой экологической группы в лесном хозяйстве включает в себя не только получение грибов как пищевого ресурса, но и рациональное использование малоценной древесины, порубочных остатков, опилок и других отходов переработки.

Из древесных сапротрофов в последнее десятилетие в странах Европы и Северной Америки наибольшее распространение получила культура вешенки обыкновенной, или устричной. Наиболее простой и более старый метод ее выращивания — это экстенсивный, или плантационный, когда, как и в случае сиитаке, отрезки древесины, зараженные мицелием вешенки, расставляют под пологом леса или роши. Новый, или интенсивный, метод выращивания вешенки был разработан венгерскими учеными. По этому методу вешенку выращивают в культивационных помещениях в течение всего года на специальном субстрате, в котором используют целлюлозную среду, содержащую стержни початков кукурузы или ее стебли, солому, опилки, отруби и другие содержащие целлюлозу материалы.

Во Франции на сельскохозяйственной научно-исследовательской станции в г. Бордо успешно выращивают вешенку на субстрате из коры деревьев и городских отходах. Это очень полезные и перспективные исследования, которые помогут в будущем выращивать на таких субстратах и другие древоразрушающие грибы, решая одновременно важнейшую проблему очистки окружающей среды от бытовых загрязнений путем их биологического раз-

ложения. Сейчас вешенку обыкновенную культивируют во многих странах, однако ее производство не превышает 20 тыс. т в год. Вероятно, это связано с тем, что еще не удалось до конца преодолеть некоторое предубеждение или инерцию потребителей по отношению к этому сравнительно новому пищевому продукту (новому съедобному грибу). В ограниченных количествах вешенка выращивается и у нас.

В последние годы интерес к ней у нас возрос, и сейчас ее выращиванием занимается несколько специализированных хозяйств. Заслуживает внимания и опыт ряда лесхозов Украины, Белоруссии и РСФСР, которые начинают все шире выращивать вешенку плантационным способом на порубочных остатках, размещая их под пологом леса или на пнях лесосек. В настоящее время этому способствует и специализированная лаборатория по выращиванию посадочного материала — стерильной грибницы вешенки на зерне, которая начала работать в начале 1986 г. в г. Апшеронске Краснодарского края. Она обеспечит качественным посадочным материалом вешенки все хозяйства страны.

Из древоразрушающих грибов в Японии и на о. Тайвань широко культивируют промышленным способом зимний гриб или фламмулину бархатистую, которую у нас еще называют зимним опенком за очень поздние сроки плодоношения. В этих странах, а также в Корее есть специализированные фермы, где этот гриб выращивают на смеси опилок или соломы с минеральными добавками в стеклянных банках. Основные процессы приготовления субстрата, наполнения банок, заражения их стерильной грибницей механизированы. Банки помещают в специальные термостатные комнаты, где регулируется температура и влажность воздуха, освещенность. Появившиеся из горлышка банки плодовые тела зимнего гриба на длинных ножках срезают, как букет цветов, а на их месте через некоторое время вырастает новый «букет грибов». Срезанные грибы специальная машина упаковывает в прозрачные пластиковые пакеты, затем охлаждают и отправляют потребителю. В Голландии тоже ведутся опыты по промышленному выращиванию зимнего гриба, причем грибоводы установили, что наиболее благоприятные результаты получаются при использовании в качестве субстрата для этого гриба среды, состоящей из 70 % опилок и 30 % рисовых отрубей, причем сбор урожая начинается очень

быстро — всего через 2—3 недели после посадки грибницы. У нас этот гриб выращивают в небольших количествах плантационным способом на отрезках древесины, в основном в Белоруссии.

Ведутся с ним и исследовательские работы. По имеющимся данным, в последнее время удачные опыты по выращиванию зимнего гриба были проведены в ФРГ. Здесь в холодное время года буковые поленья, зараженные грибницей, выдерживали в овощехранилищах, а с наступлением тепла переносили в открытый грунт. Урожай снимали осенью, причем собирали примерно по 150 грибов с одного отрезка древесины. Это хороший результат, если учесть, что значительная часть грибов достигала веса 30—50 г. Интересно отметить, что такие результаты были получены только после того, как исследователи взяли сорт из Японии. Свои европейские сорта зимнего гриба пока таких результатов не дали.

Урожаен, неприхотлив и отличается отличными вкусовыми качествами еще один древесный сапротроф — летний опенок. Микологи ГДР в 60-е годы разработали способ выращивания летнего опенка на отходах древесины. Экспериментальные работы по выращиванию летнего опенка на опилках и других отходах лесной промышленности ведутся и в нашей стране. Опенки летний можно культивировать на древесине непосредственно в лесу, а также в теплицах, парниках, подвалах. Очень перспективным и экономически выгодным является выращивание летнего опенка на специально подготовленных отрезках древесины малоценных пород. Длина такого отрезка около 25 см. Посадочный материал — специально приготовленная мицелиальная прививочная паста. Самым надежным является способ внесения этой пасты в отверстия на торцевой и боковой поверхности отрезка древесины. В этом случае мицелий легко приживается в древесине и начинает быстро распространяться вдоль волокон. Этот ответственный и трудоемкий процесс заражения древесины мицелием летнего опенка может быть механизирован. В Японии недавно сконструирован автомат, который просверливает отверстия в древесине и одновременно вносит в них мицелий. Сейчас такие автоматы применяются при культивировании шиитаке. Возможность их использования, может быть, с некоторыми конструктивными изменениями при выращивании летнего опенка не вызывает сомнений.

Формирование плодовых тел опенка летнего начина-

ется примерно через 3—4 месяца после заражения древесины мицелием. Товарного размера грибы достигают через 10—15 дней с момента их появления. Опенок летний является хорошим продуктом питания. В его плодовых телах содержатся различные органические соединения, минеральные соли и биологически активные вещества, которые не только полезны, но и придают этому грибу характерный аромат и своеобразный вкус, высоко ценимый любителями этого гриба. Мировое производство опенка летнего в настоящее время превысило 20 тыс. т в год и имеет тенденцию к росту.

Таким образом, в настоящее время только около 10 видов съедобных грибов освоено для искусственного выращивания в промышленных масштабах, хотя попытки «одомашнивания» были предприняты в отношении 65 видов грибов, относящихся более чем к 25 их родам, причем у большинства из них в лабораторных условиях было получено плодоношение. Это обнадеживает, однако экономически выгодная технология выращивания большинства этих видов еще не разработана.

В исследованиях, связанных с культивированием перечисленных видов грибов, сейчас доминируют три направления: стремление расширить круг субстратов, в первую очередь из числа отходов, упрощение технологического цикла для достижения максимальной экономичности процесса выращивания и эффективная селекционная работа по получению новых урожайных, устойчивых к болезням, специализированных для разных технологий выращивания сортов. Особенно важна селекционная работа для таких сравнительно недавно культивируемых видов, как вешенка устричная, где намечается тенденция, как и при селекции с шампиньоном двуспоровым, к получению мутантных беспоровых сортов, сочетающих высокую урожайность, хорошие вкусовые качества и значительные сроки хранения, что очень существенно, так как грибы скоропортящийся продукт и обычно требуют быстрой реализации или переработки.

Другое направление исследований, связанное с индустриализацией процесса выращивания грибов,— это разработка способа получения посадочного материала — стерильной грибницы в специальных ферментерах с автоматическим регулированием условий ее роста. Этот способ позволяет добиться большей механизации процесса, он значительно дешевле описанного выше способа пригото-

ления зерновой грибницы в банках или пластиковых пакетах и, безусловно, является очень перспективным. Разработки в этом направлении сейчас ведутся в ряде стран. Принципиально способ этот уже решен, и требуются лишь отдельные технологические доработки.

Искусственное выращивание грибов способно внести и иной, не менее важный вклад в дело обеспечения продовольствием возрастающего населения земного шара. Это способ получения биомассы мицелия съедобных грибов, которая может быть использована в качестве пищевой добавки, обогащающей белком продукты питания и придающей им грибной вкус и аромат. Для этого мицелий съедобных грибов выращивают на жидких средах, например на молочной сыворотке и др., в специальных ферментерах, в так называемой глубинной культуре. Это полностью механизированный и автоматизированный процесс. Здесь уже имеются значительные достижения. Так, в Институте микробиологии Академии наук БССР разработаны и апробированы в опытном производстве способы получения белковых грибных препаратов даедалина и пантегрин из мицелия древоразрушающих грибов дедалеопсиса бугристого и пилолистника тигрового, с высоким содержанием белка и биологически активных веществ. По содержанию белка 1 кг этих препаратов эквивалентен 2 кг мяса. По биологической ценности белок этих препаратов не уступает растительным и приближается к животным белкам. Перевариваемость белков данных препаратов составляет свыше 80 %. В основе этого способа получения пищевого белка лежат полученные микологами данные о том, что плодовые тела грибов и их грибница близки по своему химическому составу и пищевой ценности. Грибные белковые препараты даедалин и пантегрин рекомендованы в качестве пищевых добавок после соответствующего медицинского контроля. Исследования в этом направлении продолжаются.

Весомый вклад в решение проблемы питания может внести использование биомассы древесных отходов и сельхозотходов, обогащенных грибным белком за счет развития на них мицелия съедобных древоразрушающих грибов, как доброкачественного кормового продукта для животноводства. Поэтому перед наукой и техникой стоит задача разработки эффективных способов биотрансформации малоценного древесного сырья и сельхозотходов (солома и др.) в полноценный корм. Количество исследований

в этом направлении непрерывно растет как у нас в стране, так и за рубежом, о чем свидетельствует все возрастающий поток патентов в этой области. В основе такого способа получения биомассы грибов лежит процесс твердофазного ферментирования древесных и других растительных отходов с помощью грибов в больших ферментных аппаратах в полностью и автоматически регулируемых условиях, с соблюдением, как и в описанном выше способе получения пищевого белка, условий стерильности. Оба этих способа получения биомассы мицелия съедобных грибов в пищевых и кормовых целях являются фактически отраслью микробиологической промышленности, они полностью индустриализованы и относятся уже к сфере биотехнологии.

Имеется, однако, еще один важный аспект, который требует несколько иного подхода к поискам новых видов грибов для промышленного культивирования. Это возможность их использования для фармацевтических целей. Это — завтрашний день грибной индустрии, и для него имеется достаточно предпосылок. Многочисленные труды, пришедшие к нам из глубокой древности, многовековой опыт народной медицины, передающийся у некоторых народов из поколения в поколение, свидетельствуют о том, что уже тогда, и особенно в средние века, грибы наряду с высшими растениями применялись как лекарственные средства. Тем не менее в последние десятилетия изучение лечебного действия шляпочных грибов, или макромикетов, почти не проводилось, несмотря на то что во многих странах, главным образом в сельских местностях развивающихся стран, грибы применяются с лечебной целью, причем в большинстве случаев рецепты по их применению заимствованы из средневековой практики. Например, листовенничная губка — медленно растущий трутовик, встречающийся в южных районах Европы, в Северной Америке и у нас, всюду, где произрастает листовенница и кедр, была известна еще древним грекам и римлянам как отличное кровоостанавливающее и слабительное средство. В средневековых книгах о лекарственных травах сообщалось об успешном применении этой же листовенничной губки при лечении еще целого ряда заболеваний. Мы не склонны считать применение листовенничной губки всеисцеляющим средством, но необходимость серьезного изучения лечебных свойств этого гриба, как и других макромикетов, явно необходима.

Об этом свидетельствуют и современные данные. Так, согласно исследованиям, проведенным в США и Японии, грибы при известных условиях могут предупреждать болезни сердца. Исследования показали, что некоторые грибы, в частности белый гриб, обладают естественным антихолестероловым и антивирусным действием. Японские ученые выделили из грибов «этиаденин» — химическое вещество, которое снижает содержание в крови холестерина. Доказано также, что некоторые грибы могут предотвращать или облегчать гриппозные вирусные заболевания у животных. Ученые в ФРГ отмечают, что гриб сиитакэ эффективен при лечении повышенного кровяного давления. Экстракт березового гриба (трутовика), или чаги, давно уже используется в лечебных целях и даже введен в отечественную фармакопею. Но его лечебные свойства тоже изучены еще недостаточно, и в народной медицине он применяется значительно шире. Все эти данные нуждаются в дальнейшей лабораторной и клинической проверке, и только после ее окончания можно будет судить о лечебных свойствах этих грибов. Современные данные о большом количестве биологически активных веществ, содержащихся в шляпочных грибах, как в плодовых телах, так и в мицелии, свидетельствуют о перспективности использования этих грибов в медицине.

Отбор грибов для фармацевтических целей сейчас своевременен еще и потому, что люди все больше и больше предпочитают естественные лечебные средства и медикаменты из лекарственных растений искусственным химическим препаратам, нередко вызывающим болезненные и аллергические явления.

Проблема искусственного разведения грибов является сейчас весьма актуальной, поскольку она способна решить одновременно несколько важных задач: на малых площадях производить значительные количества белковой пищи для людей; без серьезных затрат значительно увеличить количество кормов для скота и искусственно разводимой рыбы, удешевить и упростить утилизацию некоторых промышленных и бытовых отходов, дать целый ряд нужных для медицины биологически активных веществ.

Интенсивные исследования в этой области продолжаются, а с 1950 г. создана Международная ассоциация по грибоводству, которая раз в три года проводит международные конгрессы по теории и практике производства съедобных грибов.

Современным концепциям в развитии грибоводства было посвящено и II Всесоюзное совещание по производству высших съедобных грибов в СССР, которое происходило в мае 1985 г. в г. Чернигове. Оно наметило основные пути исследовательской работы и практического развития грибоводства в нашей стране.

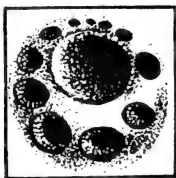
Литература

Дудка И. А., Вассер С. П., Бухало А. С., Гарибова Л. В. и др. Промышленное культивирование грибов.— Киев: Наукова думка, 1978.

Бисько Н. А., Бухало А. С., Вассер С. П., Дудка А. С. и др. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубокой культуре.— Киев: Наукова думка, 1983.

Производство высших съедобных грибов в СССР. Тезисы докладов II Всесоюзного совещания.— Чернигов, 1985.

Превращение древесины при энзиматическом и микробиологическом воздействиях. Тезисы докладов научного семинара.— Рига, 1985.



А. И. НЕСТЕРОВ,
доктор биологических наук

Биогеотехнология: состояние и проблемы

С давних времен человек использовал микроорганизмы в таких областях своей практической деятельности, как хлебопечение, сельское хозяйство. Сейчас во многих странах мира развивается микробиологическая промышленность, методы которой основаны на биохимической активности микробов. С их помощью получают лекарственные препараты, биологически активные вещества, пищевые продукты, белково-витаминные корма, удобрения. Многие биотехнологические процессы находятся в стадии их освоения человеком. К числу набирающих силу направлений биотехнологии относится биогеотехнология — использование геохимической деятельности микроорганизмов в горнодобывающей промышленности.

Своими корнями биогеотехнология уходит в геологическую микробиологию. Достижениями этой науки показана существенная, а в отдельных случаях определяющая роль микроскопических живых существ в геологических процессах, происходивших и происходящих на Земле. При этом многие микробиологические процессы протекают в природе настолько интенсивно, что могут быть использованы в хозяйственной деятельности человека. Биологические свойства различных групп микроорганизмов и особенности их жизнедеятельности в месторождениях полезных ископаемых составляют научные основы биогеотехнологии.

На современном этапе своего развития биогеотехнология представляет собой совокупность прикладных аспектов частных разделов геологической микробиологии — рудной, нефтяной и угольной. Приведенный на рис. 5 перечень основных задач, решаемых с применением микроорганизмов, свидетельствует о больших возможностях биогеотехнологии.

Биогеотехнология стихийно зародилась еще в XVI в. До нас дошли сведения о том, что в те далекие времена в Венгрии для получения меди груды добытой руды орошали водой. Этот нехитрый технологический прием оказался прообразом современного бактериально-химическо-

го метода кучного выщелачивания металлов из руд. Конечно, тогда еще не знали, что используемый процесс получения меди по своей природе является микробиологическим. Это стало известно только в 1922 г. благодаря работам немецких ученых Рудольфа и Хельброннера. По-видимому, 1922 г. следует считать официальной датой рождения биогеотехнологии. В дальнейшем биогеотехнология развивалась неровно и своего совершеннолетия достигла к началу 80-х годов нашего века. К этому времени наряду с бактериальным выщелачиванием металлов сформировались и другие разделы биогеотехнологии — удаление серы из углей, борьба с метаном в угольных шахтах, повышение нефтеотдачи пластов и поиск нефтяных и газовых месторождений. Именно об этих разделах биогеотехнологии и пойдет речь.

Биогеотехнология выщелачивания металлов — использование главным образом тионовых (окисляющих серу и серосодержащие соединения) бактерий для извлечения металлов из руд, рудных концентратов и горных пород.

На протяжении столетий человечество добывало металлы из богатых и относительно простых по химическому составу руд. Но по мере истощения запасов таких руд

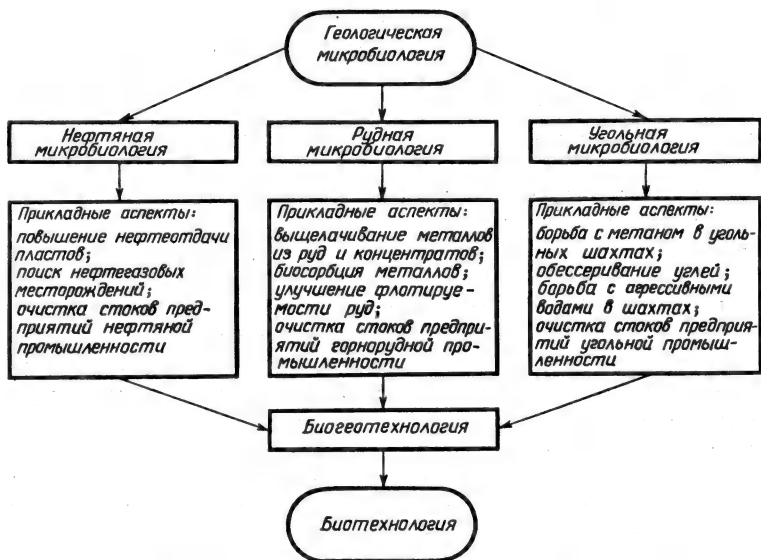


Рис. 5. Связь биогеотехнологии с геомикробиологией и биотехнологией

в переработку стали вовлекаться сложные руды, содержащие зачастую свыше 20 полезных элементов, а также руды с низким содержанием металлов. Оказалось, что при переработке бедных и сложных руд традиционные методы добычи металлов не решают остро вставших проблем рационального использования природных ресурсов и охраны окружающей среды от загрязнения. Тысячи и даже миллионы тонн ценных металлов теряются в виде отходов, шлаков, «хвостов». Происходят также выбросы вредных газов в атмосферу. Более того, из некоторых типов руд извлечение металлов по традиционным схемам затруднено или вообще невозможно. В настоящее время появились новые, более совершенные методы добычи металлов. Среди них — гидрометаллургические методы, основанные на использовании водных растворов. Разновидностью этих методов является бактериально-химическое выщелачивание металлов.

Наиболее изучено в настоящее время бактериально-химическое выщелачивание сульфидных руд. Основу этого процесса составляет окисление содержащихся в рудах сульфидных минералов тионовыми бактериями. Окисляются сульфиды меди, железа, цинка, олова, кадмия и т. д. При этом металлы из нерастворимой сульфидной формы переходят в сульфаты, хорошо растворимые в воде. Из сульфатных растворов металлы извлекаются путем осаждения, экстракции, сорбции. Одним из возможных путей извлечения металлов из растворов является адсорбция металлов клетками живых микроорганизмов, так называемая биосорбция металлов. Однако эта возможность еще только исследуется.

Окисление бактериями сульфидных минералов представляет собой пример прямого выщелачивания металлов микроорганизмами. Но микробы участвуют в выщелачивании еще и косвенно. Образующие ими сульфаты закиси железа химически окисляют сульфидные минералы, переводя содержащиеся в них металлы в раствор. Поэтому выщелачивание металлов из руд с использованием бактерий и называют бактериально-химическим.

Полезными для биоготехнологии добычи металлов свойствами обладает целый ряд микроорганизмов. Но основным из них, безусловно, является открытый в 1947 г. Колмером и Хинкелем вид тионовых бактерий, названный *Thiobacillus ferrooxidans*. Необходимую для роста энергию эти бактерии получают при окислении восстановленных

соединений серы и двухвалентного железа в присутствии свободного кислорода. Они окисляют практически все известные в настоящее время сульфиды металлов. Источником углерода для роста бактерий служит при этом углекислый газ. Характерной особенностью их физиологии является потребность в очень кислой среде. Они развиваются при рН от 1 до 4,8 с оптимумом при 2—3. Интервал температур, в котором могут развиваться бактерии этого вида, составляет от 3 до 40 °С с оптимумом при 28 °С.

Тионовые бактерии широко распространены в природе. Они обитают в водоемах, почвах, угольных и золоторудных месторождениях. В значительных количествах встречаются они в месторождениях серных и сульфидных руд. Но в условиях естественного залегания таких руд активность тионовых бактерий сдерживается отсутствием кислорода. При разработке сульфидных месторождений руды вступают в контакт с воздухом, и в них развиваются микробиологические процессы, приводящие к выщелачиванию металлов. Применяя определенные биотехнологические мероприятия, этот естественный процесс можно ускорить.

Комплекс биогeотехнологических мероприятий, обеспечивающих рентабельное извлечение металлов из сульфидных руд, складываемых в виде отвалов на поверхности земли, составляет технологию кучного способа бактериально-химического выщелачивания металлов. Основной технологической операцией этого способа является орошение отвалов добытой руды растворами, содержащими серную кислоту, ионы двух- и трехвалентного железа, а также жизнеспособные клетки тионовых бактерий. Иногда для усиления процессов выщелачивания внутрь отвала подают воздух. В таких условиях выщелачивающий раствор фильтруется через толщу руды и в результате микробиологических и химических процессов обогащается извлекаемыми из руды металлами. Затем этот раствор собирают с помощью системы коллекторов, и из него извлекают металлы одним из физико-химических методов.

Технологическая схема кучного выщелачивания металлов предусматривает многократное использование рабочего раствора. Для этого отработанный раствор после получения из него металлов собирают в регенерационном прудке. Здесь происходят процессы, сопровождающиеся увеличением численности тионовых бактерий и концентра-

ции ионов трехвалентного железа. С некоторыми добавками получаемый таким путем раствор вновь используется для выщелачивания металлов.

В настоящее время технология бактериально-химического кучного выщелачивания меди из сульфидных руд освоена более чем на 20 предприятиях мира. Ежегодно в мире таким способом добывают сотни тысяч тонн меди, или примерно 5 % от ее общей добычи. В ряде стран этим способом получают также значительные количества урана.

В тех случаях, когда содержание металла в руде очень мало и ее нецелесообразно выдавать на поверхность земли, выщелачивание проводят прямо в шахтах. Такой способ называют подземным выщелачиванием, технология его состоит в обработке растворами раздробленной или находящейся в виде относительно небольших блоков руды в условиях шахты. Обогащенные металлами отработанные растворы насосами выдаются на поверхность земли для дальнейшей обработки. Принципы составления, использования и регенерации выщелачивающих растворов при подземном способе такие же, что и при кучном выщелачивании.

Разновидностью подземного способа является выщелачивание руды в месте ее залегания в неразрабатываемых месторождениях. В этом случае рудное тело дробят взрывом и затем подвергают бактериально-химическому выщелачиванию, или же обработка рудного тела ведется через серию скважин, пробуренных с поверхности. В последнем случае выщелачивающий раствор под давлением распространяется в рудном теле по крупным порам и трещинам, пронизывающим породу. Отработанный раствор насосами подается на поверхность земли. Этот способ бактериально-химического выщелачивания представляет собой принципиально новую для гидрометаллургии технологию. Он позволяет проводить добычу металлов без строительства дорогостоящих шахтных сооружений и без тяжелого шахтерского труда. Этим способом получают медь и уран.

Методом бактериального выщелачивания можно извлекать полезные металлы не только из руды, но и из получаемых из нее рудных концентратов. Такие концентраты в значительном количестве содержат несколько ценных металлов, а также вредные примеси, такие, например, как мышьяк. С целью селективного извлечения из концентратов этих металлов и удаления вредных примесей ре-

комендован чановый способ бактериально-химического выщелачивания.

Согласно технологии чанового способа взаимодействие рудных концентратов с выщелачивающими растворами осуществляется в специальных емкостях, чанах, изготовленных из кислотоустойчивых материалов. Измельченные концентраты вместе с рабочим раствором в виде пульпы непрерывно прокачиваются через батарею последовательно соединенных чанов, в каждом из которых с нарастающей скоростью проходят процессы бактериально-химического извлечения металлов из руды. Особенностью чанового способа является возможность достижения наиболее высоких скоростей окисления сульфидных минералов за счет использования высокой концентрации тионовых бактерий и создания оптимальных условий для их жизнедеятельности. При этом все влияющие на активность микроорганизмов параметры поддаются автоматическому контролю и управлению. Чановый способ бактериального выщелачивания металлов является разновидностью процессов ферментации.

Чановый способ пока широко не используется в практике бактериального выщелачивания металлов. Но проведенные полупромышленные испытания свидетельствуют о его экономической целесообразности. Показано, что чановым способом можно извлекать медь, уран, свинец, бериллий, цинк, мышьяк, никель и кобальт из сложных по составу оловянно-медно-мышьяковых, золото-мышьяковых, медно-никелевых, медно-цинковых концентратов, а также из отходов металлургических предприятий.

Биогеотехнология обессеривания углей — использование тионовых бактерий для удаления серосодержащих соединений из углей. Как уже отмечалось, бактериальное выщелачивание может быть использовано не только для получения металлов из руд и концентратов, но и для удаления из них вредных примесей. Бактериальное выщелачивание в последнее время рассматривается и как эффективное средство для удаления сернистых соединений из углей.

Как бурые, так и каменные угли нередко содержат значительные количества серы. Общее содержание серы в углях может достигать 10—12 %. В основном сера в углях представлена сульфидом железа — пиритом. В меньших концентрациях встречаются в углях сульфатная и органическая формы серы.

При сжигании углей содержащаяся в них сера превращается в сернистый газ, который поступает в атмосферу, где из него образуется серная кислота. Из атмосферы серная кислота выпадает на поверхность земли в виде сернокислотных дождей. По имеющимся данным, в некоторых странах Западной Европы в год на 1 га земли с дождями выпадает до 300 кг серной кислоты.

Нетрудно себе представить, какой ущерб наносят кислотные дожди здоровью человека, его хозяйственной деятельности и окружающей природе. Кроме этого, высокосернистые угли плохо коксуются и поэтому не могут быть использованы в цветной металлургии.

Существующие физико-химические методы снижения содержания серы в угле, как правило, очень дороги и недостаточно эффективны. Они не решают проблем охраны окружающей среды от загрязнения серными соединениями. Микробное удаление серы из углей, по мнению специалистов, является экономически выгодным, и с ним связывают надежды на решение проблемы сернокислотных дождей. Однако пока этот метод находится в стадии лабораторных и опытно-промышленных испытаний.

Первые опыты по направленному удалению серы из угля с использованием микроорганизмов были выполнены в 1959 г. в нашей стране З. М. Зарубиной, Н. Н. Ляликовой и Е. И. Шмук. В результате этих опытов за 30 суток с участием бактерий *Th. ferrooxidans* из угля было удалено 23—30 % серы. Позднее несколько работ по микробиологическому обессериванию угля было опубликовано американскими исследователями. Им удалось с помощью тионовых бактерий снизить содержание пиритной серы в каменном угле за четверо суток почти на 50 %. Этими работами советских и американских ученых свыше 20 лет назад была доказана принципиальная возможность использования микроорганизмов для удаления серы из ископаемых углей.

Микробиологический способ удаления сернистых соединений из углей принципиально не отличается от бактериального выщелачивания металлов из руд. Основу обоих способов составляет окисление сульфидов с участием тионовых бактерий. Поэтому накопленный научный и технологический опыт применения тионовых бактерий для выщелачивания металлов может быть полностью использован при разработке рациональной технологии микробиологического удаления сернистых соединений из углей.

Этот метод будет сопровождаться попутным выщелачиванием различных металлов. Известно, что в заметных количествах содержится в углях германий, никель, бериллий, ванадий, золото, медь, кадмий, свинец, цинк, марганец. Попутное получение ценных металлов при десульфуризации угля должно дать дополнительный экономический эффект.

Таким образом, микробиологическое удаление сернистых соединений из угля, являясь реальной профилактической мерой борьбы с загрязнением окружающей среды серосодержащими соединениями, сопровождается повышением технологической ценности углей и открывает перспективы извлечения ценных металлов из угля. Не случайно в последнее время проявляется интерес к этой проблеме. Уже получен ряд патентов на способ обессеривания углей и пород с использованием бактерий *Th. ferrooxidans*. Работы по удалению пиритной серы из угля микробиологическим путем проводятся сейчас во многих странах мира. По последним сообщениям в лабораторных условиях удастся снизить содержание серы в угле путем микробиологического выщелачивания за 5 суток почти на 100 %. Микробиологический способ десульфуризации углей рассматривается как весьма перспективный.

Биогеотехнология и борьба с метаном в угольных шахтах — использование метанооксиляющих бактерий для снижения концентрации метана в угольных пластах и выработанных пространствах.

В пластах каменного угля содержится огромное количество метана, достигающее сотни кубометров в 1 т угля. При этом чем глубже залегает уголь в недрах земли, тем больше метана он содержит. При подземной добыче угля метан из разрабатываемых угольных пластов и образующихся при этом выработанных пространств поступает в атмосферу шахт. Скопления этого взрывоопасного газа в горных выработках создают постоянную угрозу для жизни шахтеров. Известны случаи крупных взрывов метана в угольных шахтах мира, унесшие сотни человеческих жизней.

Традиционные средства борьбы с метаном в угольных шахтах (вентиляция, вакуумная дегазация, увлажнение пластов водой) в условиях постоянной интенсификации горных работ и перехода на все более глубокие угленосные горизонты часто уже не могут обеспечить одновременно высокий уровень угледобычи и безопасные условия

труда. Существующие горная техника и технология позволяют добывать угля в несколько раз больше, чем его добывается сейчас. Но эти технологические возможности используются недостаточно. Чем интенсивнее ведется добыча угля, тем быстрее достигается предельно допустимая концентрация метана в горных выработках и тем чаще приходится простаивать угледобывающим механизмам. Поэтому проблема борьбы с метаном в угольных шахтах имеет важное не только социальное, но и экономическое значение. Вот почему постоянно ведется поиск новых более совершенных средств и способов снижения газообильности угольных шахт. Среди них — комплекс биогеотехнологических способов.

В основе биогеотехнологических способов борьбы с метаном лежит процесс поглощения этого газа метанооксиляющими бактериями в угольных пластах и выработанных пространствах. На данном уровне развития наук этот процесс представляет собой единственную возможность разрушения молекулы метана при температурах разрабатываемых угленосных толщ.

Для метанооксиляющих бактерий метан служит одновременно источником углерода и энергии. Примерно $\frac{1}{3}$ используемого ими метана расходуется на увеличение их биомассы, а $\frac{2}{3}$ — на образование внеклеточных органических соединений и углекислого газа. Современный уровень наших знаний об этой группе микробов в целом можно считать достаточным для их использования в биогеотехнологии.

Идея об использовании метанооксиляющих бактерий для борьбы с метаном в угольных шахтах принадлежит советским ученым. В 1939 г. А. З. Юровский, Г. П. Капилаш и Б. В. Мангуби предложили применять эти бактерии для снижения выделения метана из выработанных пространств, а спустя почти 30 лет, в 1966 г., А. И. Ксенофонтова, А. С. Бурчаков, Г. А. Могилевский и Н. В. Ножкин — для уменьшения природной газоносности угольных пластов. К настоящему времени эти идеи реализованы совместными усилиями советских микробиологов и горняков. Разработаны научные основы и промышленная технология микробиологических способов снижения концентрации метана в угольных шахтах. Сейчас эти способы нахо-

дятся в стадии совершенствования и внедрения в практику.

Несмотря на широкое распространение метанокисляющих бактерий в природе, в угольных пластах и прилегающих породах они отсутствуют. Поэтому необходимое количество активных метанокисляющих бактерий выращивают в ферментерах и в виде суспензии в питательной среде подают в поровый объем угольных пластов и выработанные пространства.

Рабочая суспензия готовится непосредственно в шахте. В рудничную воду добавляют заданное количество биомассы метанокисляющих бактерий и недостающие для их активной жизнедеятельности минеральные соли. Обычно это минеральные соединения азота и фосфора.

В угольный пласт рабочая суспензия нагнетается насосами через скважины, пробуренные по углю или из подземных выработок, или с поверхности земли: 1 т угля может принять 20—40 л рабочей суспензии. В угле микроорганизмы распределяются по трещинам и порам. Таким путем осуществляется насыщение угля метанокисляющими бактериями. Но для развития этих бактерий необходим свободный кислород, которого нет в угольных пластах. Поэтому в насыщенный метанокисляющими бактериями участок угольного пласта через те же скважины компрессором постоянно прокачивается воздух. В таких условиях бактерии потребляют содержащийся в угле метан, и за счет этого происходит уменьшение исходной газоносности угольного пласта.

Выработанные пространства представляют собой полость — щель между почвой и кровлей пласта, образующуюся по мере выемки угля. Эта щель быстро заполняется обрушениями пород кровли, оседающих под действием собственной тяжести. При этом происходит нарушение геологической структуры всех вышележащих пород. Среди них, как правило, находятся угольные пласты-спутники. Они располагаются над разрабатываемым угольным пластом на расстоянии нескольких метров и больше. При разрушении пластов-спутников из них выделяются значительные количества метана, который через выработанные пространства проникает в атмосферу угольных шахт.

Технология обработки выработанных пространств микробиологическим способом заключается в орошении на-

ходящихся здесь пород рабочей суспензией метанооксиляющих бактерий. Необходимый для микробиологического окисления метана кислород поступает в выработанные пространства с воздухом из вентиляционного потока, проветривающего подземные выработки. В результате ежедневной обработки бактериальной суспензией все новых порций обрушающихся пород создается своеобразный биологический поглотитель метана на пути его движения из выработанного пространства в шахтную атмосферу.

Микробиологические способы борьбы с метаном были неоднократно испытаны в угольных шахтах. Поступление метана как из угольных пластов, так и из выработанных пространств в ходе этих испытаний было снижено в среднем в 2 раза. При прочих равных условиях это позволяет повышать добычу угля примерно в 1,5 раза.

Эффективность микробиологических способов дегазации угольных шахт зависит от целого ряда факторов — активности и концентрации микроорганизмов в рабочей суспензии, интенсивности аэрации и длительности обработки объекта, температуры и проницаемости пород. Разработаны математические модели, описывающие зависимость интенсивности окисления метана бактериями от этих факторов.

Согласно моделям достигнутая эффективность каждого из способов может быть повышена за счет дальнейшей оптимизации технологических параметров. Дополнительный эффект по снижению газообильности угольных шахт планируется получить также путем одновременного применения разработанных микробиологических способов.

Внедрение биогеотехнологии борьбы с метаном в угольную промышленность во многом сдерживается отсутствием рациональной системы обеспечения ее необходимым количеством жизнеспособных метанооксиляющих бактерий. Принципиально вопрос этот решен. Сейчас биомасса метанооксиляющих бактерий в нашей стране нарабатывается в промышленных масштабах. Но транспортировка ее от места производства к месту применения и методы сохранения ее активности пока остаются дорогими и неудобными для широкого практического применения.

Биогеотехнология и повышение нефтеотдачи пластов — использование различных групп микроорганизмов для увеличения вторичной добычи нефти.

Нефть, как известно, является в настоящее время основным энергетическим и химическим сырьем. Однако

по некоторым прогнозам мировые запасы нефти могут быть исчерпаны уже в течение ближайших 50 лет. Вместе с тем существующая технология позволяет извлекать только половину нефти, содержащейся в месторождениях. Это обусловлено прочной связью нефти с вмещающими ее породами. Повышение нефтеотдачи пластов на 10—15 % было бы равносильно открытию новых месторождений. В связи с этим в настоящее время заметно возрос интерес к поиску путей и средств повышения вторичной добычи нефти. Основная задача, которая при этом решается, состоит в том, чтобы отделить от породы нефть, не извлекаемую методами первичной добычи. С этой целью широко используется вытеснение нефти водой, нагнетаемой в пласт под большим давлением. Предлагается также закачивать в нефтеносный пласт поверхностно-активные вещества, различные вязкие растворы, водяной пар, газы. Исследуется и возможность использования геохимической деятельности микроорганизмов для увеличения вторичной добычи нефти.

Первое предложение применить микроорганизмы для повышения вторичной добычи нефти было сделано в 1926 г. американским ученым Бекманом. Через 20 лет Зобеллом в США были проведены первые лабораторные эксперименты по этой идее и получен патент на способ «бактериальной обработки нефтеносной формации». Зобелл пришел к заключению, что применение микроорганизмов может привести к повышению нефтеотдачи пластов вследствие следующих микробиологических процессов: 1) образования кислот, в частности углекислоты, растворяющих известковые породы и тем самым повышающих их коллекторные свойства; 2) образования газообразных продуктов, таких, как метан, углекислый газ, сероводород, азот, водород, которые, растворяясь в нефти, увеличивают ее подвижность; 3) разрушения нефтяных углеводородов до более подвижных низкомолекулярных соединений; 4) выделения поверхностно-активных веществ, уменьшающих прочность связи нефти с породой; 5) замещения нефтяных пленок, обволакивающих поверхность пород, клетками сорбирующихся на них микроорганизмов. Эти научные положения явились теоретической основой для последующего поиска практических подходов к повышению нефтеотдачи за счет активности микроорганизмов.

Все проведенные испытания микробиологических способов повышения вторичной добычи нефти как на

лабораторных моделях пласта, так и в условиях нефтепромыслов можно разделить на три группы. В первую группу входят эксперименты, проведенные с использованием сульфатредуцирующих бактерий, во вторую — микроорганизмов, развивающихся на углеводах мелассы, и в третью — комплекса углеводородокисляющих и метанобразующих бактерий.

Предложение применить сульфатвосстанавливающие бактерии для повышения нефтеотдачи пластов исходило от Зобелла. Он предлагал специально выращивать большое количество этих бактерий и закачивать их в нефтеносный пласт. Планировалось получить увеличение нефтеотдачи главным образом за счет образования бактериями газа — сероводорода. Однако экспериментальная проверка предложения Зобелла показала, что геохимическая активность сульфатвосстанавливающих бактерий не увеличивает нефтеотдачу пластов. Более того, процесс микробиологического восстановления сульфатов до сероводорода является крайне нежелательным в этих условиях. Он приводит к загрязнению нефти и попутного газа сероводородом, выпадению в осадок сульфидов, закупоривающих полезные поровые каналы в нефтеносных породах, и усиливает коррозию нефтяного оборудования. Поэтому сейчас остро стоит вопрос о разработке способов подавления процесса микробиологического восстановления сульфатов в эксплуатируемых нефтяных месторождениях.

Промысловые эксперименты, в которых в нефтяной пласт через скважины закачивали мелассу вместе со сбраживающими ее микробами, были неоднократно проведены как в СССР, так и за рубежом. Но только Караскевичем в Польше был получен стойкий положительный эффект. Нефтеотдача была повышена на 20—30 %.

Использование комплекса углеводородокисляющих и метанобразующих бактерий для увеличения нефтеотдачи пластов основано на активации геохимической деятельности этих микробов в нефтяной залежи, куда они попадают вместе с закачиваемыми через скважины поверхностными водами. Активация названных микробиологических процессов достигается путем аэрации закачиваемых вод и добавления в них минеральных солей азота и фосфора. Недостаток этих химических элементов чаще всего лимитирует активность микрофлоры в природных условиях.

Нагнетание в нефтяную залежь обогащенной кислородом и минеральными солями воды приводит к образованию аэробной зоны в нефтеносном пласте вокруг нагнетательной скважины. Здесь начинают интенсивно идти процессы разрушения нефти аэробными углеводородокисляющими микробами. Это сопровождается накоплением углекислого газа, водорода и низкомолекулярных органических кислот, которые поступают в анаэробную зону нефтяной залежи. Здесь они превращаются метанобразующими бактериями в метан. Разрушение нефти и образование газов приводят к разжижению нефти и повышению газового давления в нефтеносном пласте, что и должно сопровождаться увеличением дебита нефти из добывающих скважин.

Из рассмотренных выше способов микробиологического воздействия на нефтеносный пласт последний вариант является предпочтительным. Он не требует таких трудоемких и дорогих мероприятий, как наращивание биомассы микроорганизмов и нагнетания в пласт богатых органических веществ типа мелассы.

По мнению отечественных и зарубежных специалистов, микробиологические способы повышения нефтеотдачи пластов являются перспективными. Они признаются экономически более выгодными, чем существующие небактериологические методы. К преимуществам микробиологических способов относятся небольшие капитальные затраты и отсутствие необходимости в специальных инженерно-технических разработках. В то же время отмечается, что применение этих способов связано с решением ряда проблем. Основными из них являются сложность и неоднородность физико-химической структуры нефтяных залежей как среды для жизнедеятельности микроорганизмов, потенциальная опасность возникновения микробной сульфатредукции, трудности контроля микробиологических процессов в условиях нефтяной залежи.

Кроме прямого непосредственного влияния микроорганизмов на состояние нефти в разрабатываемом нефтяном месторождении, в качестве возможного рассматривается также косвенное использование микроорганизмов для повышения нефтеотдачи пластов. В данном случае микроорганизмы выступают как продуценты биополимеров типа полисахаридов и поверхностно-активных веществ. Получаемые биополимеры применяются как вязкие растворы, закачиваемые в нефтяные пласты для интенсификации вторичной добычи нефти.

Биогеотехнология и поиск нефтяных и газовых месторождений — использование микроорганизмов, окисляющих углеводородные газы, в качестве индикаторов нефтегазовых месторождений.

Микробиологический, или, как его еще называют, гео-микробиологический, метод поиска нефтяных и газовых месторождений был предложен в СССР в 1937 г. Г. А. Могилевским. В основе метода лежит существование так называемого бактериального фильтра над залежами нефти и газа. Оно обусловлено вековой миграцией углеводородных газов из нефтегазовых месторождений в поверхностные слои земли. Здесь газы поглощаются углеводородокисляющими микроорганизмами как источники углерода и энергии для их жизнедеятельности. Следствием этого является повышенное количество и активность углеводородокисляющей микрофлоры в образцах пород, почв и природных вод над залежами нефти и газа. Наиболее надежными индикаторами на нефтегазовые залежи оказались бактерии, окисляющие пропан, бутан и некоторые более тяжелые углеводородные газы.

Технология геомикробиологической разведки нефтяных и газовых месторождений состоит в отборе природных образцов на больших территориях и определении в них численности или активности индикаторной микрофлоры. Образцы почв и пород отбираются специальными пробоотборниками с глубины 2 м и более. Обследуются также пробы воды из естественных водоисточников и подземных вод. Количество индикаторных микробов или их активность в отобранных образцах определяют обычными методами геомикробиологии. В последнее время стали учитывать в образцах численность отдельных видов индикаторных углеводородокисляющих микроорганизмов, используя непрямой метод иммуннолюминесценции.

Результаты такой бактериальной съемки выбранного района наносят на карту. Точки отбора проб с наиболее высокой численностью индикаторных микробов соединяют, оконтуривая таким образом область геомикробиологической аномалии. Эта область и должна соответствовать расположению нефтяной или газовой залежи. Отсутствие таких аномалий указывает на отрицательный результат поиска.

Почти за 50 лет своего существования геомикробиологический метод был испытан на нескольких десятках площадей, перспективных на нефть и газ. Метод исполь-

зуется как самостоятельный, так и в комплексе с другими видами прямых поисков нефти и газа. Наиболее эффективным оказалось сочетание геомикробиологического метода с методом газовой съемки. Эффективность газобактериальной разведки на нефть и газ составляет в среднем 65—70 %. При этом ни на одной из площадей, охарактеризованных отрицательно микробиологическим методом, при последующем бурении признаков нефти и газа обнаружено не было.

Целесообразность сочетания газовой и бактериальной съемки наиболее отчетливо проявляется в тех случаях, когда поток углеводородных газов из нефтегазовых залежей в подпочвенный слой невелик и практически весь поглощается бактериальным фильтром. В таких случаях на основании определения концентрации подпочвенных газов можно пропустить продуктивную залежь нефти или газа.

Роль бактериальной съемки в комплексе поисковых работ по нефти и газу сводится к тому, чтобы показать, нужно ли в данном районе проводить разведку нефтегазовых месторождений дорогостоящими физическими методами и бурением. Особенно ценным оказалось применение геомикробиологического поиска нефти и газа в тех случаях, когда сейсморазведка не выявляет закономерности геологической структуры исследуемого района.

Экономический эффект применения геомикробиологического метода достигается за счет сокращения объема геофизической разведки и бурения на бесперспективных площадях. Этот эффект, естественно, значительно возрастает в случае открытия новых месторождений нефти или газа.

В настоящее время газобактериальный метод поиска нефтегазовых месторождений поддерживается и развивается учениками Г. И. Могилевского. В ограниченном масштабе метод применяется в нескольких районах СССР. Основными задачами дальнейших исследований в данной области биогеотехнологии является разработка более совершенных методик и аппаратуры для отбора природных образцов, углубленное изучение физиологии и экологии индикаторных микроорганизмов, разработка экспрессных методов оценки их активности, использование методов математической обработки получаемых данных, создание передвижных геомикробиологических лабораторий для ведения работ в полевых условиях.

Среди рассмотренных примеров биогеотехнологического воздействия на состояние продуктивных пород месторождений полезных ископаемых можно выделить две группы. В одну группу входят способы, требующие наработки биомассы используемых микроорганизмов и их последующего введения в объект воздействия. Наиболее выразительным представителем этой группы является комплекс микробиологических способов борьбы с метаном в угольных шахтах. Ко второй группе относятся биогеотехнологические мероприятия, обеспечивающие повышение активности микрофлоры, уже имеющейся в объекте воздействия. Характерным представителем этой группы способов является кучное и подземное выщелачивание металлов из руд.

Конечно, биогеотехнологические способы, не требующие искусственного введения микробов в обрабатываемые породы, являются предпочтительными. Они более технологичны и дешевы. Однако опыт показывает, что при использовании таких способов концентрация микроорганизмов в объекте воздействия, как правило, не бывает оптимальной. Например, считается, что одним из резервов повышения эффективности бактериального выщелачивания металлов является увеличение численности тионовых бактерий в рабочих растворах на один-два порядка. В связи с этим обеспечение необходимым количеством активной биомассы используемых микробов является одной из основных проблем микробной биогеотехнологии.

В комплексе биогеотехнологических операций микроорганизмы являются основным технологическим элементом. Необходимость управления ходом микробиологических процессов требует постоянного расширения и углубления наших знаний о биологии применяемых при этом групп микроорганизмов.

За исключением бактериально-химического способа кучного выщелачивания металлов из руд, способы микробной биогеотехнологии пока не нашли широкого практического применения. Время покажет, какие из разрабатываемых сейчас способов получат путевку в жизнь. Но несомненно, что биогеотехнология находится на подъеме и имеет хорошие перспективы. Она призвана внести важный вклад в решение важнейших проблем современности — охраны окружающей среды и рационального ис-

пользования природных ресурсов. Кроме этого, биогео-технология может обеспечить более безопасные условия труда, повысить культуру производства и производительность труда в горнодобывающей промышленности и тем самым способствовать ускорению научно-технического прогресса в нашей стране.

Литература

Кузнецов С. И., Иванов М. В., Ляликова Н. Н. Введение в геологическую микробиологию.— М.: Изд-во АН СССР, 1962.

Розанова Е. П., Кузнецов С. И. Микрофлора нефтяных месторождений.— М.: Наука, 1977.

Биогеотехнология металлов. Труды международного семинара и международных учебных курсов.— М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1985.

**СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ
ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ**

Производства, использующие микроорганизмы, выпускают продукты как микробиологического, так и немикробиологического происхождения. В первом случае целевой продукт производства — результат микробного синтеза. Во втором — микробиологические стадии вовлекаются в процесс приготовления продукта, имеющего животное или растительное происхождение. К такого рода производствам относится древняя биотехнология сыроварения, виноделия, пивоварения, хлебопечения, приготовления молочнокислых продуктов, квашения овощей, силосования.

Продукты микробного синтеза, имеющие промышленное значение, подразделяют на три главные категории:

- 1) микробные клетки;
- 2) вещества с большими молекулами — ферменты, ингредиенты вакцин, инсектицидов;
- 3) вещества с маленькими молекулами. Их, в свою очередь, подразделяют на:

а) первичные метаболиты (компоненты, существенные для роста); б) вторичные метаболиты (компоненты, не существенные для роста).

Микробные клетки используют для трансформации веществ. Они служат также источником белков (белки одноклеточных), витаминов, ферментов. На основе биомассы готовят вакцины и другие медицинские препараты, бактериальные удобрения (нитрагин, азотобактерии), инсектициды.

Ферментная промышленность производит главным образом экстрацеллюлярные ферменты. Амилазы используют в пивоварении, хлебопечении, текстильной промышленности, протеазы — в пивоварении, для тендеризации (размягчения) мяса, для замены сычужного фермента (ренина) в сыроделии, изготовления детергентов и кожи; мультиферментные композиции применяют в сельском хозяйстве для улучшения качества кормов, в медицине.

Промышленно важные продукты первичного метаболизма — аминокислоты, ферменты, пуриновые нуклеотиды, полисахариды, некоторые витамины, органические кислоты, этанол. Наиболее важные продукты вторичного метаболизма — антибиотики, токсины, алкалоиды, факторы роста растений.

В промышленности получают микробную биомассу, биоэтанол, ацетон, бутанол, глицерин, лимонную, молочную, уксусную кислоты, которые используют как сырье и субстраты для разных синтезов, а также некоторые аминокислоты, нуклеотиды, полисахариды, витамины, антибиотики, гормоны и белковые лекарственные препараты.

Многие из этих веществ образуют только микроорганизмы, источником других могут быть также растения, ткани и органы животных или химический синтез. Выбор способа определяется экономическими соображениями. Главное внимание обращается на стоимость сырья и способность продуцента полнее утилизировать субстрат, превращая его при этом в основном в целевой продукт. Учитывается также стоимость очистки, потенциальная стоимость побочных продуктов и стоимость их уничтожения. Около 200 веществ микробного происхождения обладает коммерческой ценностью.

Самое крупное микробиологическое производство — производство микробной биомассы. Оно призвано возместить острый дефицит пищевого и кормового белка и понизить уровень загрязненности окружающей среды промышленными, городскими и другими отходами за счет их утилизации микроорганизмами.

Белок невозможно заменить другими питательными веществами. Самые ценные белковые продукты — мясо, молоко, яйца дают сельскохозяйственные животные. Однако сами животные получают белковой пищи недостаточно, поскольку в растительных кормах (кроме сои) белка мало и он неполноценный, ибо в нем недостаточно незаменимых аминокислот: лизина, метионина, триптофана, треонина. В результате рост животных замедляется, а для его нормализации нужно в 1,5—2 раза увеличить затраты растительных кормов, избыток которых с трудом усваивается. Микробная биомасса может быть хорошей белковой добавкой для животных с однокамерным желудком и жвачных, а также для других домашних животных, птиц и рыб.

Производство микробной биомассы особенно важно для стран, не культивирующих в больших масштабах сою (соевую муку используют как традиционную белковую добавку к кормам).

В целом микробная биомасса богата лизином, но бедна серосодержащими аминокислотами. Самое низкое содержание белка в нитчатых грибах, самое высокое — в бакте-

риях, причем в бактериальном белке наиболее высокое содержание метионина и цистина. Методами генной инженерии удастся изменить аминокислотный состав белка. Ценность микробной биомассы определяется также содержанием в ней важных витаминов, микроэлементов и некоторых уникальных питательных факторов.

При получении микробной биомассы перед микробиологами стоит задача получения продукта с высоким содержанием белка: чем оно больше, тем выше ценность препарата. А содержание белка находится в прямой зависимости от удельной скорости роста микроорганизма. Поэтому при выборе микроорганизма учитывают удельную скорость роста и выход биомассы на данном субстрате, стабильность при поточном культивировании, величину клеток. Клетки дрожжей крупнее, чем бактерий, и легче отделяются от жидкости при центрифугировании. Можно выращивать полиплоидные мутанты дрожжей с крупными клетками. В настоящее время известны только две группы микроорганизмов, которым присущи свойства, необходимые для крупномасштабного промышленного производства: это дрожжи рода *Candida* на *n*-алканах (нормальных углеводородах) и бактерии *Methylophilus methylotrophus* на метаноле.

Из 20 аминокислот, входящих в состав белков, 8 аминокислот люди не могут синтезировать, и их относят к незаменимым. Это изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, валин, фенилаланин. Аминокислоты — это не только питательные вещества, но также ароматические и вкусовые агенты, и потому они широко используются в пищевой промышленности. Как питательную добавку в пищу чаще всего вносят лизин и метионин. Глутамат натрия и глицин употребляют как ароматические вещества для усиления и улучшения вкуса пищи. У глицина освежающий, сладкий вкус. Его вводят в сладкие напитки, и кроме того, он проявляет там бактериостатическое действие. Цистеин предотвращает подгорание пищи, улучшает пекарские процессы и качество хлеба.

Аминокислоты в большом количестве применяют как добавку к растительным кормам, которые дефицитны по метионину, треонину, триптофану и особенно по лизину. Если в животных белках содержится 7—9 % лизина, то в белках пшеницы — только около 3 %. Внесение в корма лизина до содержания 0,3 % позволяет сократить их расход больше чем на 20 %. За последние 8 лет количество

аминокислот, добавляемых в корма, выросло в 14 раз.

Во многих странах метионин добавляют к соевой муке — белковой добавке кормов. Главная область практического применения аминокислот — обогащение кормов. Около 66 % общего количества аминокислот, получаемых в промышленности, используют в кормах, 31 % — в пище и 4 % — в медицине, косметике и как химические реактивы.

В медицине применяют аргинин. В сочетании с аспаратом или глутаматом он помогает при заболевании печени. К-Na-аспарат снимает усталость и облегчает боли в сердце, его рекомендуют при заболевании печени и диабете. Цистеин защищает SH-ферменты в печени и других тканях от окисления и оказывает детоксицирующее действие. Он проявляет также защитное действие от повреждений, вызываемых облучением. Дигидроксифенилаланин и D-фенилаланин эффективны при болезни Паркинсона. Его аналог — 5-гидроксил-L-триптофан — используют как психотерапевтическое средство. Из полиаминокислот получают хороший материал для хирургии.

На основе аминокислот готовят искусственный подсластитель — метиловый эфир L-аспартил-L-фенилаланина, который в 150 раз слаще, чем глюкоза.

Аминокислоты применяют также в косметике. Для поддержания нормальной функции кожи в кремы добавляют аргинин, глицин, L-аланин, валин, цистеин, метионин, треонин, аспарагиновую и глутаминовую кислоты.

Благодаря некоторым бактериям удается получать около 100 г/л глутаминовой аминокислоты. Ежегодно в мире производят микробиологическим способом 270 000 т этой аминокислоты, основная часть которой идет в пищевую промышленность. По объему продукции второе место после глутаминовой кислоты занимает лизин — 180 000 т в год. Другие аминокислоты производят в гораздо меньших количествах. В СССР для медицинских целей получают кристаллический лизин, а для животноводства — кормовые препараты.

В 1981 г. общий объем производства антибиотиков составил несколько десятков тыс. т. Среди них преобладают пенициллины, тетрациклины и цефалоспорины. Предполагается, что и в дальнейшем антибиотики останутся главными продуктами среди фармацевтических препаратов, поэтому их получение и производство относятся к важнейшим задачам промышленной микробиологии. На-

ряду с крупнотоннажными производствами работают микробиологические производства меньшего масштаба. Некоторые из них имеют тенденцию к расширению, например промышленность ацетона и бутанола, основанная на ацетоно-бутиловом брожении, биоэтанола, витаминов и витаминных препаратов, биоинсектицидов и ряда других. Всего путем микробного синтеза производят и выпускают около 200 продуктов.

Промышленная микробиология участвует в решении важнейших задач, которые стоят перед современным обществом: восполнении дефицита белка на земле, добычи биотоплива для возмещения постепенно исчерпывающихся ископаемых топливных запасов, охраны здоровья людей, очистки окружающей среды от загрязнений и охраны окружающей среды.

В перспективе главной продукцией микробиологических производств останутся сложные специальные вещества, такие, как ферменты, стабилизаторы, инсектициды, ПАВы, ароматообразующие вещества, полисахариды, облегчающие добычу нефти, стероиды, антибиотики и др. Ведутся поиски новых веществ с фармакологическим действием. С этой целью изучают новые кофакторы и пигменты метаногенов и других археобактерий. Как источники ферментов исследуют экстремальные термофилы и галофилы.

И в настоящем и будущем важное значение будут иметь работы по сохранению ценных свойств штаммов, сконструированных методами генетической инженерии, созданию новых штаммов и усовершенствованию уже имеющихся.

Перспективное направление промышленной микробиологии — разработка способов микробной утилизации возобновляемых субстратов. К возобновляемым субстратам относится биомасса растений, содержащая трудно усвояемые лигно-целлюлозные материалы. С помощью микроорганизмов, обладающих лигно- и целлюлолитическими ферментами, возможно превращение этого дешевого субстрата в белковые продукты, биоэтанол, метан и одновременная очистка окружающей среды, так как целлюлоза составляет основную часть промышленных и бытовых отходов. Лигнин рассматривают как источник получения ароматических веществ: фенола и бензина, поэтому очень важны исследования микроорганизмов, способных его гидролизовать.

Один из перспективных субстратов для получения микробной биомассы и «чистого» биотоплива — водород. В этой связи изучают различные биологические системы. Большие надежды возлагаются на биофотолитическое разложение воды цианобактериями под действием солнечного света. Если такая система будет создана, то общество получит практически неиссякаемый и постоянно возобновляемый источник топлива, поскольку вода, образующаяся при сгорании водорода, сама будет служить субстратом для его выделения.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
<i>Л. И. Воробьева</i> , доктор биологических наук.	
Археобактерии	4
<i>Е. В. Ананьев</i> , доктор биологических наук,	
<i>В. Н. Башкиров</i> , кандидат биологических наук.	
Генетическая инженерия растений: проблемы и перспективы	25
<i>В. И. Дуда</i> , доктор биологических наук. Новые формы анаэробных бактерий: расширение го- ризонтов биотехнологии	42
<i>Н. Н. Сухарева-Немакова</i> , доктор биологиче- ских наук. Простейшие как объекты биотех- нологии	58
<i>М. Э. Тальянский</i> , доктор биологических наук.	
Биотехнология и безвирусное растениеводство	77
<i>А. Х. Тамбиев</i> , кандидат биологических наук.	
Новое направление в альгологии	96
<i>Л. В. Гарибова</i> , доктор биологических наук.	
Грибная индустрия сегодняшнего дня . . .	115
<i>А. И. Нестеров</i> , доктор биологических наук.	
Биогеотехнология: состояние и проблемы	136
Приложение	154

БИОЛОГИЯ НАШИХ ДНЕЙ. Сборник Вып. 2.

Составитель — кандидат биологических наук
Александр Хапачевич Тамбиев

Главный отраслевой редактор *А. Нелюбов*

Редактор *Н. Феоктистова*

Мл. редактор *Н. Карячкина*

Художник *Н. Беляева*

Худож. редактор *М. Бабицева*

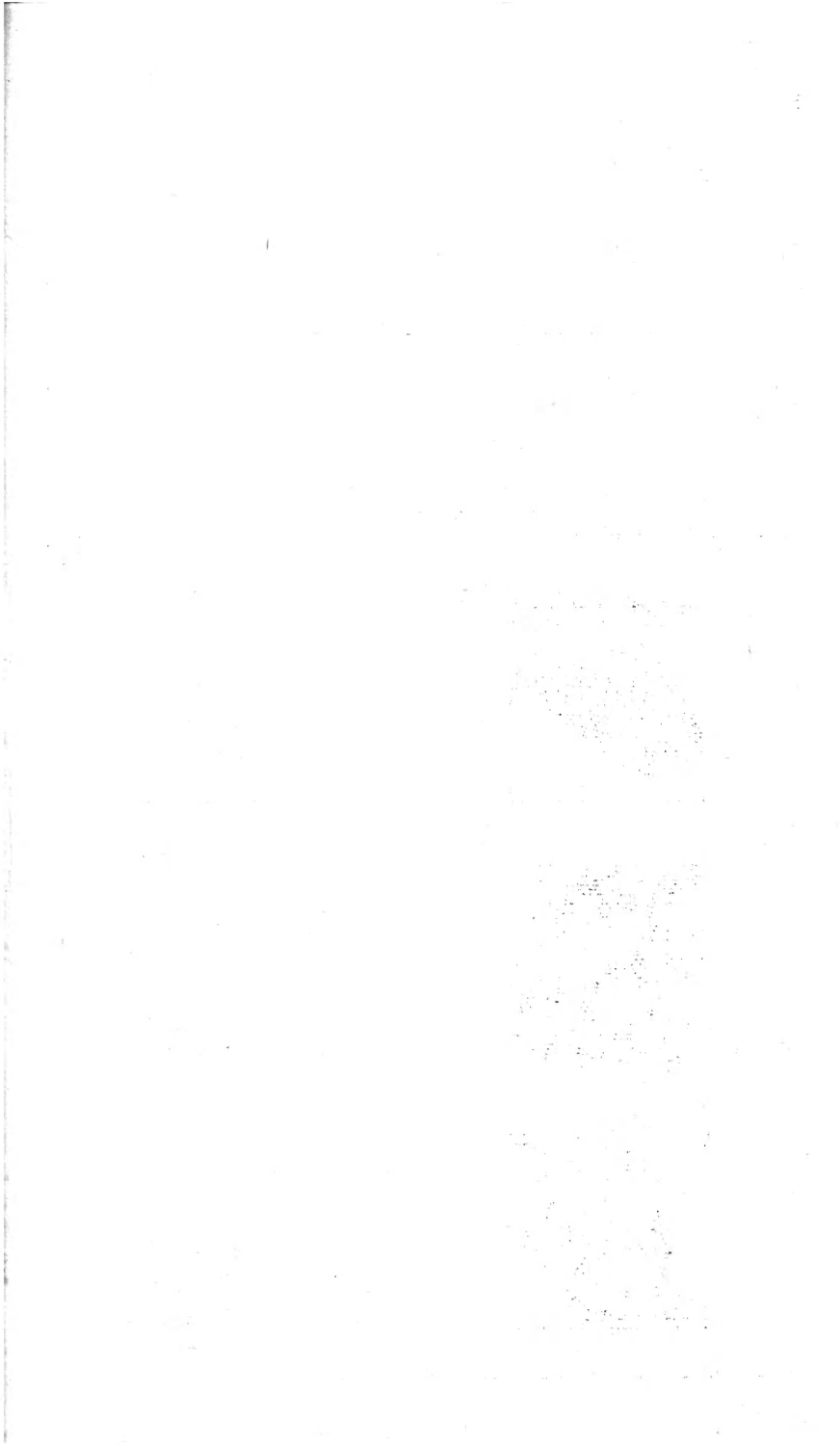
Техн. редактор *Н. Калюжная*

Корректор *Н. Мелешкина*

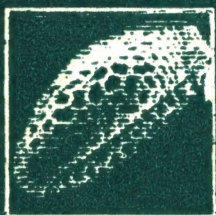
ИБ № 8484

Сдано в набор 19.03.87. Подписано к печати 07.09.87. А 10097.
Формат бумаги 84×108¹/₃₂. Бумага тип. № 1. Гарнитура лите-
ратурная. Печать высокая. Усл. печ. л. 8,40. Усл. кр.-отт. 8,72.
Уч.-изд. л. 8,94. Тираж 40 000 экз. Заказ 7—976. Цена 50 коп.
Издательство «Знание». 101835, ГСП, Москва, Центр, проезд
Серова, д. 4. Индекс заказа 876716.

Головное предприятие республиканского производственного
объединения «Полиграфкнига». 252057, Киев-57, ул. Довженко, 3.



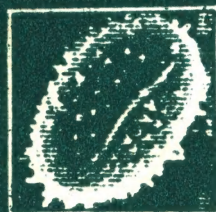
БИОЛОГИЯ НАШИХ ДНЕЙ



ПРОСТЕЙШИЕ
КАК ОБЪЕКТЫ
БИОТЕХНОЛОГИИ



ГРИБНАЯ ИНДУСТРИЯ
СЕГОДНЯШНЕГО ДНЯ



БИОТЕХНОЛОГИЯ
И БЕЗВИРУСНОЕ
РАСТЕНИЕВОДСТВО